

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

ERF B1-a 基因群在植物青枯病與

非生物逆境反應之功能研究

Roles of tomato ERF cluster B1-a in response
to bacterial wilt and abiotic stress responses



Tsung-Lin Yang

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

ERF B1-a 基因群在植物青枯病與
非生物逆境反應之功能研究

Roles of tomato ERF cluster B1-a in response
to bacterial wilt and abiotic stress responses

本論文係楊宗霖君 (R97B42009) 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



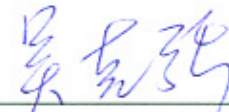
中央研究院植物暨微生物學研究所

符宏勇 博士



臺灣大學植物科學研究所

吳克強 博士



臺灣大學農藝學系暨研究所

張孟基 博士



臺灣大學植物科學研究所

鄭秋萍 博士 (指導教授)



謝誌

本論文承蒙指導教授鄭秋萍老師於論文撰寫期間的細心指導，並且不時花費時間在邏輯以及觀念上進行討論。平時個別討論實驗，老師時常不吝賜教並且給予我許多的思考方向與實驗建議，及提供一些相關實驗的經驗談，著實使我獲益良多，對於老師的諄諄教誨，學生謹記在心，在此謹致上我最由衷與誠摯的感謝，所謂一日為師，終身為父，好高興也很幸運成為 942 家庭的一份子，而於口試期間承蒙詹明才老師、符宏勇老師、張孟基老師、吳克強老師對於本論文提供寶貴的建議，使得本論文不完美之處得以更加完整，在此亦致上對老師的由衷謝意。另外，感謝趙光裕老師與王自存老師在實驗技術上的鼎力協助，也感謝梅君、慧娟、雅鈴、丹筑(大媽)、輝哥、以君、亞臻學姊們在實驗儀器的操作上不遺餘力的指導，得以順利完成實驗。

於研究所生涯中，感謝實驗室同仁，怡君(IC)：嚴謹與細膩都是我學習的榜樣，你家真得有溫馨的氣氛；玉梅：謝謝你無私的為實驗室奉獻，不過趕緊存結婚基金吧；賢慧的淑蓮：啟蒙我對阿拉伯芥的更加認識，謝謝你；德康：很喜歡跟你一起打棒球，很厲害，祝你幸福美滿；安琪(劉委員)：你讓我見識到人體 NCBI 資料庫的強大威力，哈拉打嘴砲少不了你一咖，謝謝你建議了許多實驗的細節與規劃，還有驗證許多預言(pocker face ~)；永義(師傅的師傅)：謝謝你一開始教我生物資訊，也開啟五個基因的研究故事；巧燕：很高興坐你旁邊的 bench 一起實驗，懷念你穩重的實驗風格，讓你每天聽我在默默哼歌，希望你幸福快樂；鐸駿師傅(Rocker 丁丁)：感謝你教導我許多實驗上知識與技術，容忍我跟前跟後的學習，懷念在 bench 上的哈拉聊天測 titer，2011 跨年的臭豆腐我永遠忘不了，我們座位後面的 101 大樓煙火很清楚喔，下次 PK 籃球；冠中(罔興)：台大美食都是你帶我去嘗鮮，著實讓我胖了不少，也認識不少的“宅言宅語”；千惠(千千)：唱歌一定要有你這樣的 HIGH 咖，喜歡跟你一起唱歌，以後唱歌記得算我一份，趕快找到好歸宿(如果 30 歲以後...你知道我意思的!!)；文潔：希望你有一天可以跟到“哲青”的國外旅行團，“關鍵時刻的討論”只有你最可以呼應我，真得是奇女子；一起實驗的夥伴們，季穎：很高興與你共事，PTT 宅人非你莫屬，看著你從單身到戀愛，P.S 金牛座的男生其實真得不錯啲!加油~；芸璐：很高興跟你同窗兩年半，跟阿超有好消息，要記得發喜帖給我，也感謝你提供很威的作圖軟體；雅婷：我們一起度過許多喜怒哀樂，一起進行與討論許多實驗，植物組有你的加入真好，希望你的琵琶造詣能更上一層樓，氣質加分，國家音樂廳等你來喔；實驗室的新血們，盈茹(接班人)：接下來的任務，我相信你可以勝任，加油；詠竹(大寶貝)：你的人與唱歌都太像“品冠”了，往演藝圈發展不錯；張芯：很欣賞你大刺刺，防窺片有加分喔；益敏：有趙丁丁的影子，不虧是坐在那個實驗桌的接班人，在此一併向所有實驗室成員致謝，謝謝你們，祝你們永遠幸福快樂！

最後，最應該感謝的，莫過於自出生以來一直辛勤付出的爸、媽、小凱(感謝你陪我找到居身之處)及其他家人，還有天上的阿嬤謝謝您守護著我，提供最堅實的後盾，使我得以無後顧之憂並順利的完成學業，僅將謝誌獻給每一個曾經在我的人生路上給我鼓勵的你們，凡走過必留下痕跡，接下來就要進入人生另一旅程，大家加油吧!!

宗霖 2011 台北春天

中文摘要

各種生物性及非生物性逆境造成植物生長過程受限，而青枯病 (bacterial wilt) 是全球最嚴重的作物病害之一，但目前對於植物如何抵抗這類土壤傳播病害的防禦機制了解仍少。植物特有的乙烯反應轉錄因子 (ethylene-response factors, ERFs) 屬於 APETALA2 (AP2)/ethylene-responsive-element-binding protein (EREBP) 超級家族中的家族成員之一，在植物的逆境訊息傳遞反應中扮演重要角色。本研究針對番茄 *ERF B1-a* 基因群五個成員 (分別命名為 *SIERF B1a-1,-2,-3,-4,-5*) 在植物青枯病及缺水相關逆境反應之功能進行探討。本研究顯示番茄 *ERF B1-a* 蛋白群均位於細胞核內，皆具抑制轉錄活性的功能，但此五個基因的表現在植物不同組織及對青枯病菌感染、缺水逆境或植物防禦荷爾蒙處理有獨特性，且 VIGS 分析結果也顯示這些基因植物在防禦青枯病與乾旱逆境的反應上各有特殊影響。綜合 *SIERF B1a-1* 的過量表現與短暫靜默之結果，推斷此基因在青枯病害與鹽害扮演正面角色，但在乾旱逆境扮演負面角色；然而，*SIERF B1a-3* 則在鹽害扮演正面角色，但在青枯病害與乾旱逆境扮演負面角色。此外，這兩個基因也參與乙烯/茉莉酸相關防禦途徑的調節。另一方面，*SIERF B1a-1* 在阿拉伯芥中之同源基因 *At5g44210* 的完全缺失突變株在鹽害、模擬乾旱、滲透壓、糖分及 ABA 之種子發芽率降低，但對青枯病、軟腐病及缺水逆境之反應則未有顯著改變。綜合目前結果顯示，五個 *ERF B1a* 基因可能對植物防禦反應及相關非生物逆境的耐受性各具獨特的功能。未來期望透過更深入探討 *SIERF B1a* 基因群在病害與非生物逆境之功能，建立 *ERF B1a* 基因群的抗逆境防禦機制與網絡。

關鍵字：乙烯反應轉錄因子、青枯病、缺水逆境、*At5g44210*

Abstract

Plants constantly encounter a wide range of abiotic and biotic stresses, leading to tremendous crop losses. Plant bacterial wilt (BW), a serious vascular disease caused by *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), is one of the most complex and serious crop diseases worldwide. However, information on plant defense response to systemic soil-borne diseases is very limited. Ethylene-response factors (ERFs) are a subfamily of the APETALA2 (AP2)/ethylene-responsive-element-binding protein (EREBP) transcription factor superfamily and unique to plants. ERFs play a pivotal role in plant signaling transduction pathways switching extracellular signals into cellular responses. In this study, roles of five uncharacterized members of tomato ERF cluster B1-a, namely *SIERF B1a-1,-2,-3,-4,-5*, in plant response to BW and water deficit (WD) are investigated. These ERFs localize in nucleus and confer transcriptional repression activity. These genes display differential transcriptional expression patterns in various tissues and under, treatments of *Rs*, drought and defense phytohormones, implying they may have distinct functions. VIGS assays further revealed their differential roles in tomato defense to BW and water deficit (WD) response. Results of functional analyses by VIGS and transgenic overexpression suggest that *SIERF B1a-1* may play a positive role in defense to BW and salinity, and a negative role in drought. However, *SIERF B1a-3* may play a negative role in defense response to BW and drought, and a positive role in salinity. Furthermore, functioning of these two genes involves ET/JA (ethylene/jasmonic acid)-related pathways. On the other hand, reduced seed germination rates of *Arabidopsis at5g44210* null mutants, an orthologous gene of *SIERF B1a-1*, indicated a function of this gene in various abiotic stresses. However, mature plants of the null mutants displayed unaltered response to *Rs*, *Pectobacterium chrysanthemi* and drought treatments. Together, these results demonstrate important overlapping and differential roles of the studied ERF cluster B1-a members in plant response to biotic and abiotic stresses. These studies, along with further suggested analyses, are expected to decipher multiple functions of these proteins and to establish the related regulatory networks in plant stress responses.

Keywords: Ethylene-response factors (ERFs), bacterial wilt (BW), water deficit (WD), *At5g44210*

縮寫與全名對照表

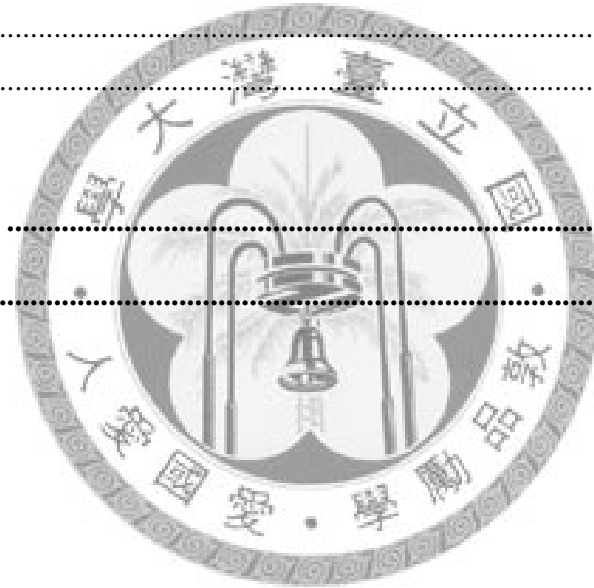
縮寫	全名
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
BW	Bacterial wilt
CFU	Colony formation unit
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
ERFs	Ethylene-response factors
EAR motif	ERF-associated amphiphilic repression motif
EtBr	Ethidium bromide
EPS	Exopolysaccharide
EF1a	Elongation factor 1a
GFP	Green fluorescence protein
GW	Gateway
JA	Jasmonic acid
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
MV	Methyl viologen
MS	Murasghige and Skoog
ORF	Open reading frame
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase chain reaction
PEG 4000	Polyethylene glycol 4000
PLACE	Plant cis-acting regulatory DNA elements
<i>PR</i> gene	Pathogenesis-related gene
Rpm	Rotation per minutes
RT-PCR	Reverse transcription PCR
<i>Rs</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
SAR	Systemic acquired resistance
<i>SlERF</i>	<i>Solanum lycopersicum ethylene-response factor</i>
SM1	Semi-selective medium
Tris	Tris (hydroxymethyl aminomethane)
TTC	2, 3, 5-triphenyl- tetrazolium chloride
VIGS	Virus-induced gene silencing
WD	Water deficit

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.....	v
目錄.....	vi
表目錄.....	ix
圖目錄.....	x
附錄目錄.....	xi
第一章 前言.....	1
1. 番茄簡介.....	1
2. 番茄青枯病 (Bacterial wilt, BW) 之介紹.....	1
3. 植物對於青枯病害之相關功能性研究.....	1
4. 植物於非生物逆境之研究.....	3
5. 植物荷爾蒙對植物生長之影響.....	4
6. 植物轉錄因子 AP2/EREBP 超級家族之介紹.....	5
7. 病毒誘導性基因靜默 (Virus-induced gene silencing, VIGS).....	8
8. 研究動機與目標.....	9
第二章 材料與方法.....	11
1. 植物材料簡介.....	11
2. 基因選殖常用實驗.....	11
3. 植物 RNA 萃取.....	15

4. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR).....	17
5. 抽取植物 DNA	19
6. 短暫性病毒誘導性基因靜默.....	20
7. 番茄不同組織樣品之收取.....	23
8. 番茄以真空吸引浸透法 (vacuum-infiltration) 接種青枯病菌之樣品製備.....	23
9. 番茄處理植物荷爾蒙乙烯、水楊酸、茉莉酸、離層酸	23
10. 番茄乾旱處理之樣品製備.....	24
11. 蛋白質定位分析 (sub-cellular localization).....	25
12. 轉錄活性分析法 (Transactivation assay).....	26
13. 利用農桿菌 LBA4404 進行菸草 (<i>Nicotiana benthamiana</i>) 轉殖.....	28
14. 植物之逆境檢測.....	28
第三章 結果.....	32
1. 利用生物資訊分析番茄 <i>SIERF B1-a</i> 基因群親緣關係及啟動子元素.....	32
2. <i>SIERF B1-a</i> 基因群蛋白在植物細胞的表現位置.....	32
3. <i>SIERF B1-a</i> 基因群轉錄活性之分析.....	32
4. <i>SIERF B1-a</i> 基因群在抗病品系番茄各組織之表現.....	33
5. 植物荷爾蒙處理番茄後 <i>SIERF B1-a</i> 基因群之表現.....	33
6. 番茄青枯病抗病與感病品系接種病菌後 <i>SIERF B1-a</i> 基因群之表現.....	34
7. 缺水逆境處理番茄後 <i>SIERF B1-a</i> 基因群之表現.....	34
8. 番茄之 <i>SIERF B1a</i> 基因群經 VIGS 後對青枯病之反應.....	35
9. 番茄之 <i>SIERF B1a</i> 基因群經 VIGS 後對缺水逆境之反應.....	36
10. 過量表現 <i>SIERF B1a-1</i> 與 <i>SIERF B1a-3</i> 之轉基因菸草對非生物逆境之反應.....	36
11. 過量表現 <i>SIERF B1a-1</i> 與 <i>SIERF B1a-3</i> 之轉基因菸草對病害逆境之反應.....	37
12. 過量表現 <i>SIERF B1a-1</i> 與 <i>SIERF B1a-3</i> 之轉基因菸草中檢測標誌基因表現.....	38
13. 利用生物資訊分析 <i>SIERF B1a</i> 基因群在阿拉伯芥中之同源基因特性.....	38

14. 阿拉伯芥 <i>At5g44210</i> 同源基因剔除株對非生物逆境下之反應	39
15. 阿拉伯芥 <i>At5g44210</i> 同源基因剔除株對病害逆境之反應	39
第四章 討論	40
1. <i>SIERF B1a</i> (group VIIIa) 蛋白表現於細胞核內且具抑制轉錄能力	40
2. 番茄 <i>SIERF B1a-1</i> 基因正調控青枯病與鹽害抗性但負調控乾旱耐受性	40
3. 番茄 <i>SIERF B1a-3</i> 基因負調控青枯病與乾旱抗性但正調控鹽害耐受性	42
4. 番茄 <i>SIERF B1a-2/4/5</i> 基因成員有不同的獨特性	43
5. 阿拉伯芥同源基因 <i>At5g44210</i> 完全缺失突變株對非生物逆境的耐受性降低	45
6. 總結	46
第五章 未來展望	47
參考文獻	49



表目錄

表一、番茄 <i>SIERF Bla</i> 基因群其上游 3000 bp 啟動子區域之 putative <i>cis</i> -elements 與數目.....	63
表二、VIGS 基因靜默所使用之引子及所用片段之基因靜默專一性.....	64
表三、番茄抗青枯病品系經 <i>SIERF Bla</i> 基因群靜默後植株內青枯病菌量增生情形.....	65
表四、番茄 <i>SIERF Bla</i> 基因群在阿拉伯芥中的 ortholog 基因.....	66
表五、利用生物資訊進行阿拉伯芥基因的微陣列分析.....	67



圖目錄

圖一、番茄 <i>SIERF B1-a</i> 基因群與阿拉伯芥之胺基酸序列比對與親緣分析	70
圖二、 <i>SIERF B1a</i> 蛋白之表現位置	71
圖三、 <i>SIERF B1a</i> 基因群轉錄活性分析	72
圖四、 <i>SIERF B1a</i> 基因群於 H7996 番茄組織之表現情況	73
圖五、 <i>SIERF B1a</i> 基因群於 H7996 番茄處理植物荷爾蒙後的表現情況	74
圖六、 <i>SIERF B1a</i> 基因群於抗/感病品系接種青枯病菌後之表現情況	75
圖七、 <i>SIERF B1a</i> 基因群於 H7996 番茄品系乾旱逆境後之表現情況	76
圖八、半定量 RT-PCR 檢測 <i>SIERF B1a</i> 基因群之靜默效率	77
圖九、番茄抗病品系中靜默 <i>SIERF B1a</i> 基因群後檢測抗青枯病能力	78
圖十、番茄感病品系中靜默 <i>SIERF B1a-3</i> 基因後檢測抗青枯病能力	79
圖十一、靜默 H7996 番茄 <i>SIERF B1a</i> 基因群後植株之乾旱測試	80
圖十二、檢測 35S:: <i>SIERF B1a-1</i> 與 35S:: <i>SIERF B1a-3</i> 轉殖菸草中基因之表現量	81
圖十三、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-1</i> 幼苗在非生物逆境之耐受性分析	82
圖十四、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-3</i> 幼苗在非生物逆境之耐受性分析	83
圖十五、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-1</i> 成株葉片對 NaCl 與氧化逆境之耐受性測試	84
圖十六、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-3</i> 成株葉片對 NaCl 與氧化逆境之耐受性測試	85
圖十七、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-1</i> 成株對乾旱之耐受性測試	86
圖十八、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-3</i> 成株對乾旱之耐受性測試	87
圖十九、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-1</i> 成株對青枯病之抗性測試	88
圖二十、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-3</i> 成株對青枯病之抗性測試	89
圖二十一、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-1</i> 中逆境反應相關標誌基因之表現	90
圖二十二、菸草 35S:: <i>SIERF B1a-3</i> 中逆境反應相關標誌基因之表現	91
圖二十三、 <i>At5g44210</i> 之 T-DNA 嵌入突變體的分子檢測	92
圖二十四、 <i>At5g44210</i> 剔除株於非生物逆境下之種子萌發測試	93
圖二十五、 <i>At5g44210</i> 剔除株之乾旱反應測試	94
圖二十六、 <i>At5g44210</i> 剔除株之病害反應測試	95

附錄目錄

附錄一、 <i>SIERF3 (LeERF3)</i> 基因在抗病品系 H7996 進行 VIGS 檢測植物體內細菌增生的情形.....	96
附錄二、綜合 <i>SIERF B1a</i> 基因群在組織與遭受青枯病及非生物逆境時之表現...	97
附錄三、 <i>SIERF B1a</i> 基因群進行轉錄活性之分析.....	98
附錄四、番茄經細菌相關 PAMP 處理後其 <i>SIERF B1a</i> 基因群的表現.....	99
附錄五、檢測番茄防禦路徑相關基因靜默後其 <i>SIERF B1a</i> 基因群之表現情形...	100
附錄六、搜尋番茄 EST 資料庫 <i>SIERF B1a</i> 基因群在不同組織中之表現情形....	101
附錄七、搜尋番茄 <i>SIERF B1a</i> 基因群在阿拉伯芥之 ortholog 基因的組織表現情形.....	102
附錄八、青枯病菌 (<i>Ralstonia solanacearum</i>) 感染植物的過程.....	103
附錄九、乙烯合成的途徑	104
附錄十、乙烯對植物的影響與其調控網絡.....	105
附錄十一、乙烯受器基因家族之介紹.....	106
附錄十二、乙烯訊息傳遞途徑.....	107
附錄十三、AP2/ERF 基因家族之構造與 domain 結構及 EAR motif.....	109
附錄十四、阿拉伯芥 AP2/ERF 超級家族之親緣關係.....	110
附錄十五、AP2/ERF domain 在植物中之演化過程.....	111
附錄十六、用於 TA cloning 的 pCR8®/GW/TOPO® 與 pCR®II-TOPO® 載體...	112
附錄十七、表現 <i>SIERF B1a</i> 綠色螢光重組蛋白所使用的載體.....	113
附錄十八、TRV-based VIGS vectors.....	114
附錄十九、阿拉伯芥及菸草轉殖載體之構築.....	115
附錄二十、本研究中所使用的引子.....	116
附錄二十一、本研究常用培養基及藥劑.....	119

第一章 前言

1. 番茄簡介

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 屬多年生草本植物，具 12 對染色體，基因體大小為 950 Mb (9.5×10^8 bp)，是全球第二重要的茄科 (*Solanaceae*) 作物。其富含茄紅素 (lycopene)、 β 胡蘿蔔素 (β -carotene) 及類黃酮 (flavonoid) 等化合物，是高營養的作物，近年來更發現其具抗氧化及防癌功能，被評估具有許多醫療效用 (Dorais et al., 2008)。由於番茄在生長過程中易發生病害，造成產量損失，在全球氣候變遷的影響之下，非生物逆境如乾旱與鹽害等對於番茄而言也影響甚大，因此關於如何增進番茄對於這些環境威脅的耐受性顯得格外重要 (Oksman-Caldentey et al., 2007)。

2. 番茄青枯病 (Bacterial wilt, BW) 之介紹

青枯病，又稱為細菌性萎凋病害，是由革蘭氏陰性菌 *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) 所引起之植物病害，*R. solanacearum* 屬於 β -proteobacteria 且具長鞭毛之桿菌，其最適好氧生長環境 (Denny, 2006)。此病害亦為全球重要之土壤傳播性維管束病害，危害許多重要經濟作物，如番茄、香蕉、馬鈴薯等，危害之作物範圍包括五十幾屬，超過 200 多種作物，是番茄前五大重要病害之一 (Morris et al., 2009)。病原菌通常存在耕地土壤中，病菌經由泳動性趨向宿主植物根部的組織如根尖或側根突出點進入植物的維管束組織並進行感染，並且會在木質部導管大量增生並且產生豐富具黏性的胞外多醣體，阻塞維管束的水份運輸造成萎凋，植物萎凋死亡後其組織中的病菌又會被釋放到土壤中等待時機進行感染，遭受感染的植物其致死率極高 (Genin, 2010) (附錄八)。又因植株快速萎凋枯萎時外表呈青綠色，故得名「青枯病」，但目前為止卻無任何有效的化學防治方式，造成嚴重的農業減產及經濟損失。

3. 植物對於青枯病害之相關功能性研究

3.1 阿拉伯芥對青枯病害之研究

目前對於植物抗青枯病之防禦機制研究不多，多著重探討青枯病菌其生態及演化方面，針對植物與青枯病的交互作用作以下介紹，前人研究即指出，阿拉伯

芥抗青枯病之 Nd-1 品系，即藉由 RRS1-R (RESISTANT TO RALSTONIA SOLANACEARU 1) 抗病蛋白參與在 SA 途徑，並調控下游 *NDR1* (non race-specific disease resistance 1) 和 *EDS1* (enhanced disease susceptibility 1) 等相關防禦基因之表現，進而達抗病效果 (Deslandes et al., 2002)。於阿拉伯芥 *ein2-1* 與 *coil-1* 各別突變體接種青枯病菌，顯示有延遲發病趨勢，推論乙烯與茉莉酸可能參與在抗青枯病防禦機制 (Hirsh et al., 2002)；反之，參與合成初級細胞壁的基因突變後會誘導啟動 ABA 防禦途徑，增加抗病能力，阿拉伯芥 *abil-1*、*abi2-1* 與 *aba1-6* 突變株接種青枯病菌後，則呈現高度感病趨勢，推測 ABA 於對抗青枯病菌反應中，亦扮演重要角色 (Hernandez-Blanco et al., 2007)。

為了防禦病原菌攻擊，植物演化抗性蛋白可專一辨認病原菌 avirulence effectors，進而誘導不親合性反應。當青枯菌將無毒性 (avirulence) effector PopP2 送入植物體內後，會被植物具有菌株專一性 RRS1-R 蛋白辨識啟動植物之抗病機制 (Deslandes et al., 2003；Lahaye, 2004)。在抗青枯病的阿拉伯芥中具 cysteine protease 功能的 RD19 蛋白 (RESPONSIVE TO DEHYDRATION 19) 部分參與青枯病菌 PopP2 的交互作用，並進入細胞核中啟動 RRS1 基因進行防禦反應 (Poueymiro et al., 2009)，此防禦免疫反應除抗病植物對病原菌的不親合性作用外，其次藉由 PopP2 本身具備乙醯轉移酶活性，可將 RRS1-R 基因進行乙醯化作用而啟動防禦反應 (Poueymiro and Genin, 2009)。

阿拉伯芥 *wrky53* 與 *wrky27* 突變株會延遲青枯病的病程發展，進一步利用 *WRKY27* 啟動子在 *wrky27* 突變株進行基因互補，實驗結果顯示加速發病，因此推論 *WRKY27* 對於青枯病扮演負調控的角色 (Murray et al., 2007；Mukhtar et al., 2008)，大麥的 *HvRAF* (*Hordeum vulgare* root abundant factor) 轉錄因子過量表現在阿拉伯芥中，顯示增加青枯病之抗病性 (Jung et al., 2007)。

利用阿拉伯芥感青枯病品系 Landsberg *erecta* (*Ler*) 與抗青枯病品系 Columbia (Col-0) 的重組自交系 (recombinant inbred lines, RILs) 進行 QTL (Quantitative trait locus) 連鎖圖譜分析，結果顯示分別在三個 *QRS1/2/3* (Quantitative Resistance to *R. solanacearum*) 基因座上發現與抗病性相關聯，其中靠近 *QRS1* 基因座的是 *ERECTA* 基因，其為白胺酸重複激酶 (LRR receptor-like kinase protein)，並且參與對抗青枯病的防禦反應 (Godiard et al., 2003)。

3.2 茄科植物對於青枯病害之研究

目前研究在茄科植物與青枯病菌交互作用機制的仍不多，僅知道番茄抗青枯病之機制複雜，利用基因定位研究發現不同接菌方法或菌系於同一抗病品種可找到相同或不同 QTL 基因座 (Wang *et al.*, 2000)，番茄青枯病的發病表現與番茄體內的病菌濃度相關，當菌量高達每克植物組織含有 10^9 至 10^{10} 菌落形成單位 (colony-forming unit, CFU) 時，可使番茄產生萎凋病徵 (Wang and Lin, 2005)，在番茄抗病品系 H7996 體內會產生多酚物質 (polyphenol) 進而抑制青枯病菌進行感染 (Vasse *et al.*, 2005)。將阿拉伯芥防禦基因 *AtNPR1* (*non-expressor of pathogenesis-related genes 1*) 或 *Thi2.1* (*thionin 2.1*) 過量表現的番茄轉殖株可增加對青枯病的抗性，顯示番茄可能藉由水楊酸或茉莉酸防禦途徑抵抗青枯病 (Lin *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005)，本實驗室利用 VIGS 系統研究番茄與青枯病菌的抗病機制，顯示水楊酸、乙烯與 MAPK 相關傳導途徑的基因也參與對抗青枯病的反應 (Chen *et al.*, 2009)，在番茄分離的 *TSRF1* (*Tomato stress responsive factor1*) 轉錄因子不僅影響 ABA 生合成也會增加抵抗青枯病的能力 (Zhou *et al.*, 2008)。在青枯病感染番茄的過程中藉由產生殺菌物質進行防禦，經研究證實抗病番茄於感染後第 12 及 48 小時在根部大量產生過氧化氫 (H_2O_2)，藉由氧化機制達到抑制青枯病菌的攻擊，反之，於感病番茄則是感染後第 24 個小時才在根部偵測到少量過氧化氫，顯示抗/感病番茄體內的氧化爆起作用機制 (oxidative burst) 確實能影響對於青枯病的抵抗能力 (Mandal *et al.*, 2010)。在菸草中分離出 19 個 RsRGs 基因 (*R. solanacearum*-responsive genes)，接著針對兩個 *Ntshsp17* (*tobacco small heat shock protein 17*) 與 *NbSGLP* (*Nicotiana benthamiana* SGP-like protein) 基因進行 VIGS 基因靜默後再接種青枯病菌，結果顯示靜默植株更為感病，檢測菸草葉部組織的菌量也有顯著的上升 (Kiba *et al.*, 2007; Maimbo *et al.*, 2007; Maimbo *et al.*, 2010)。在生物防治方面，利用真菌寄生性腐霉菌 (*Pythium oligandrum*) 可使番茄減少青枯病害，且腐霉菌可以誘導番茄體內茉莉酸協助對抗青枯病害 (Hase *et al.*, 2008)。

4. 植物於非生物逆境之研究

植物受到環境的壓力影響最大的因素之一為氣候變化，特別是全球氣候的劇

烈變遷例如溫室效應 (global warming) 造成暖化，嚴重影響植物的生長與產量 (Tuteja and Sopory, 2008)。農作物的產量潛力有三分之二的影響是由於不利的環境逆境因素所造成，例如：溫度變化劇烈、缺水乾旱 (water deficit) 等，這些可造成作物幾乎百分之百的產量損失，嚴重影響至農產經濟，另一方面，全世界人口估計到 2050 年將達到約 100 億，伴隨著糧食短缺的問題影響的人民生計 (Seki et al., 2007; Gill and Tuteja, 2010; Hirayama and Shinozaki, 2010)。此外，環境的變化所造成的缺水逆境，導致植物過量散失水分喪失膨壓造成細胞傷害，所形成的滲透壓逆境影響植物生長發育，其次植物體內也會產生離層酸導致植物氣孔閉合，以及誘導抵抗乾旱基因的表現 (Seki et al., 2007)。在植物生理的相關研究報導，指出分析植物在缺水或植物種子發育期間，植物體內會累積蔗糖、海藻糖 (trehalose) 以及 RFOs (Raffinose family oligosaccharides)，而這些醣類化合物能避免乾旱對於植物造成傷害，故被認為參與植物及種子的耐旱性 (Fernandez et al., 2010)。此外，植物缺水除了導致醣類累積，亦會產生多元胺 (Polyamines, PAs) 與 proline 胺基酸 (Groppa and Benavides, 2008)，故了解植物對各種非生物逆境的耐受性對於目前農業所面臨的不利因素都是相當重要的。

5. 植物荷爾蒙對植物生長之影響

當植物在生長發育的過程中遭受生物及非生物逆境時，植物體內會產生包括：水楊酸 (salicylic acid, SA)、乙烯 (ethylene, ET)、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 與離層酸 (abscisic acid, ABA)、油菜素甾醇類化合物 (brassinosteroids, BR)、生長素 (auxins)、細胞分裂素 (cytokinins, CK)、吉貝素 (gibberellins, GA) 植物荷爾蒙進行防禦反應以及調節生長發育 (Lumba et al., 2010)。其中影響植物抵抗生物性逆境的荷爾蒙如下所述，水楊酸會誘導植物體產生系統防禦反應 (systemic acquired resistance, SAR) 與過敏性反應 (hypersensitive response, HR)，也透過活化下游 PR (pathogenesis-related) 相關基因之表現有效參與防禦作用 (Deslandes et al., 2002; Jones and Dangl, 2006)；其次，茉莉酸皆為植物在遭遇病原菌感染或蟲咬等逆境時所生成的揮發氣體分子，可經空氣散播至相鄰植株提高防禦反應，也藉由活化其訊息傳遞途徑活化下游防禦基因如 *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN1.2*) 基因的表現，SA 與 JA 會產生互相結抗作用，彼此抑制合成與訊息傳遞 (Brown et al., 2003)；

乙烯是氣態植物荷爾蒙，影響許多植物生理及分化的功能，包含種子萌發、果實成熟以及生物與非生物逆境的反應等，乙烯亦與茉莉酸、水楊酸、葡糖糖等途徑存在著廣泛的交互反應，共同調控植物生長發育，乙烯在植物體內合成然後被受器接受後，開始進行乙烯訊息傳遞，經一連串複雜的調控，最後啟動與乙烯調控相關的保護與防禦基因表現 (Schaller and Kieber, 2002; Xu et al., 2006; Kendrick and Chang, 2008; Stepanova and Alonso, 2009) (附錄九-附錄十二)。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，進而結合於抗乾旱相關基因之啟動子上游的 ABREs (ABA-responsive regulatory elements) 順式因子 (*cis-elements*)，藉以活化啟動抗乾旱相關基因 (Pandey et al., 2005)，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。

6. 植物轉錄因子 AP2/EREBP 超級家族之介紹

轉錄因子 AP2/EREBP (APETALA2/ethylene-responsive element binding proteins) 為植物特有的轉錄因子，係許多基因所組成的超級家族 (superfamily) (McGrath et al., 2005)。在 2010 年 Dietz 的研究歸納發現，在阿拉伯芥的基因組中，目前已具有基因編碼功能的約 1,600 個轉錄因子中，最大的轉錄因子家族即為 AP2/EREBP 約占 9%，由此可見 AP2/EREBP 超級家族對於植物的影響是佔有很大的地位 (Dietz et al., 2010)。在高等的植物中，目前已在單子葉以及雙子葉被鑑別出多種具 AP2/EREBP 轉錄因子存在，在雙子葉阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 有 147 個 (Nakano et al., 2006)、番茄有 112 個 (Sharma et al., 2010)、大豆 (*Glycine max*) 有 148 個 (Zhang et al., 2008)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 有 124 個 (Licausi et al., 2010) and 白楊樹 (*Populus trichocarpa*) 有 200 個 (Zhuang et al., 2008)。在單子葉方面有水稻 (*Oryza sativa* var. japonica) 有 163 個 (Sharoni et al., 2010)。此外，蕨類植物的江南卷柏 (*Selaginella moellendorffii*) 有 57 個、藻類植物的衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 及小球藻 (*Chlorella* sp. NC 64a) 有 14 個 (Dietz et al., 2010)。

對於 AP2/EREBP 超級家族的特性分類，後來 Nakano 等學者 (2006) 又將阿拉伯芥的 AP2/EREBP 超級家族進行重新組織，除了 Sakuma 等學者 (2002) 依據該胺基酸序列是否包含 AP2/ERF domain 與 B3 domain 分類外，又納入轉錄抑制因子特有序列 EAR motif (ERF-associated amphiphilic repression) 與 MAP 或 casein 蛋白激酶的磷酸化位置 (phosphorylation sites) 進行分類，而其中 DREB/ERF 次家族總共 122 個總共佔據約 83% (Sakuma et al., 2002; Nakano et al., 2006) (附錄十三與附錄十四)。

乙烯反應轉錄因子 (Ethylene-responsive factor, ERF) 為 AP2/EREBP 超級家族之次家族，首先在在茄科植物菸草 (*Nicotiana tabaccum*) 被發現 (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995)，在胺基酸結構上具有經演化保留由 60 至 70 個胺基酸所組成之高保守性 AP2/ERF domain，且其 N-terminal 區域由三個 β -sheet 形成二級結構，具有與 DNA 結合的功能，C-terminal 區域具有雙極性 α 螺旋 (Amphipathic α -helix) 的結構，與蛋白質和蛋白質的交互作用有關 (Jofuku et al., 1994; Brown et al., 2003; Tournier et al., 2003)。

在植物中，ERF 轉錄因子已被證實參與在生長發育調控，例如將 *BOLITA* 基因大量表現的阿拉伯芥轉殖株造成植株變小，過量表現 *LpCBF3* (*Lolium perenne* *CBF3*) 基因的阿拉伯芥植株較矮小且延遲開花 (Marsch-Martinez et al., 2006; Xiong and Fei, 2006)，在非生物逆境上，番茄 *JERF3* (*Jasmonate and ethylene responsive factor 3*) 基因轉殖菸草具抗鹽分與氧化逆境 (Wang et al., 2004; Wu et al., 2008)，甘蔗 *SodERF3* (*Saccharum officinarum* *ERF3*) 基因過量表現之轉殖菸草，也可增加對鹽分與乾旱逆境的耐受性 (Trujillo et al., 2008)，*HRE1* (Hypoxia Responsive ERF1) 與 *HRE2* (Hypoxia Responsive ERF2) 的阿拉伯芥轉殖株增加對缺氧逆境的抵抗能力 (Licausi et al., 2010)。ERF 也被證實參與在植物防禦反應，過量表現阿拉伯芥 *ERF1* 基因顯示對灰黴病 (*Botrytis cinerea*) 與 *Plectosphaerella cucumerina* 所引起的真菌性病害具有抵抗能力 (Berrocal-Lobo et al., 2002)，其次過量表現 *NiERF5* 基因的菸草轉殖株，結果顯示具抵抗菸草鑲嵌病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) 的感染 (Fischer and Droge-Laser, 2004)，單子葉小麥 *TiERF1* 與 *TaPIEP1* (*Triticum aestivum* *pathogen-induced ERF*) 亦具有正向調控對根腐病菌 (*Bipolaris sorokiniana*) 的防禦反應 (Liang et al., 2008; Dong et al.,

2010)。上述文獻證實 ERF 的確參與生長發育與對抗環境逆境都扮演重要角色。

另一方面，植物轉錄因子大致可分成轉錄活化和抑制因子兩類。其中 ERF B1-a 基因群 (group VIII) 之 EAR motif 影響著轉錄因子的活性，Ohta 等學者在 2001 年發現 class II 的 ERF 基因群，包括菸草的 NtERF3 以及阿拉伯芥的 AtERF3 與 AtERF4，在轉錄作用的過程中扮演轉錄的主動抑制蛋白 (active repressors) 的角色，分析其胺基酸序列發現 C 端有 6 至 8 個高度保留胺基酸序列，序列組成如下 $^L/FDLN^L/F(X)P$ ，並且將此段序列命名為 EAR motif (Ohta et al., 2001; Kazan, 2006)。截至目前為止，至少發現有四種主動抑制轉錄區的 motif 序列，且其中 EAR motif 占植物轉錄因子 10 至 25%，其數量與相關作用機制的了解較為豐富 (Kagale and Rozwadowski, 2011)。

截至目前為止轉錄抑制可能的機制有三種；第一種轉錄抑制子本身可負調控下游基因表現；第二種即推測與泛素化作用 (Ubiquitination) 相關：研究指出菸草 NtERF3 轉錄抑制因子透過泛素化作用與 E2 結合酵素 (ubiquitin-conjugating enzyme) 進行交互作用，調控 NtERF3 本身的抑制轉錄活性 (Koyama et al., 2003)；第三種是屬於蛋白質與蛋白質的交互作用：前人研究發現 AtERF7 蛋白的 EAR motif 區域會與共同抑制子 (co-repressor) AtSin3 (SWI-independent 3) 交互作用後再結合 AtHDA19 (histone deacetylase 19) 蛋白，利用組蛋白乙醯化的機制將轉錄的活性降低，造成轉錄抑制的結果 (Song et al., 2005)。在 2010 年 Pauwels 等學者最新研究發現，在茉莉酸的缺乏的情況下，JAZ (jasmonate ZIM domain) 蛋白與 bHLH (basic helix-loop-helix) MYC 轉錄因子及 NINJA (Novel Interactor of JAZ) 轉錄抑制子結合，NINJA 的 EAR motif 進一步結合 Groucho/Tup1-type TOPLESS (TPL) 以及 TPL-related proteins (TPRs) 共同抑制蛋白，進而抑制相關受茉莉酸調控的基因表現 (Pauwels et al., 2010)。另外，其他參與轉錄抑制的 co-repressor，例如：AtSAP18 (SIN3-associated polypeptide of 18 kDa)、SUPERMAN、AUX/IAA (auxin/indole-3-acetic acid)、HSI2 (high level expression of sugar inducible gene 2)、AGL15 (agamous-like 15) 與 NIMIN (NIM1-interacting)，這些皆能與 EAR motif 進行交互作用，再與組蛋白去乙醯化酶 HDA19 形成複合體，利用組蛋白乙醯化的機制將轉錄的活性降低，造成轉錄抑制的結果，以上文獻說明轉錄抑制因子其 EAR motif 是藉由 co-repressor 協助產生基因轉錄抑制效果 (Hiratsu

et al., 2002 ; Tiwari et al., 2004 ; Weigel et al., 2005 ; Song et al., 2006 ; Tsukagoshi et al., 2007 ; Szemenyei et al., 2008 ; Hill et al., 2008)。

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

植物、動物和真菌界廣泛存在一種基因調控現象，生物為了對抗病原菌在感染時所侵入的外來核酸片段，演化出基因靜默的機制亦稱為 RNA 干擾 (RNA interference) 機制，為具有序列專一性的降解系統 (sequence-specific RNA degradation system)，藉調控 RNA 的水平來抑制基因表現 (McGinnis, 2010)。若利用病毒體內帶有與植物基因序列相同的片段，經由感染轉送進入植物體內，也可造成植物體的基因表現被抑制，這個現象稱為病毒誘導基因靜默，其原理是利用小片段專一的 RNA 序列，並經由特定 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 的作用形成雙股 RNA，並經過 DCLs (Dicer-like proteins) 剪切成連續約 21 至 25 個核苷酸稱為 siRNA (small interfering RNA)，經由 RISC (RNA intermediate silencing complex) 的作用辨識專一特定序列，進一步結合到與其序列互補之 mRNA 上並降解目標 mRNA，使其無法轉譯而達到基因靜默 (Burch-Smith et al., 2004)。

最早被應用的 VIGS 載體是從菸草鑲嵌病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 所發展的 TMV 載體 (Kumagai et al., 1995)，接著 Ruiz 等學者 (1998) 根據馬鈴薯病毒 X (*Potato virus X*, PVX) 發展出 PVX 載體 (Ruiz et al., 1998)，以及根據番茄金色花葉病毒 (*Tomato golden mosaic DNA virus*, TGMV) 發展出 TGMV 載體 (Peele et al., 2001)，這些載體都對宿主範圍的有限制，且感染後會產生病徵等缺點存在，因此 Liu 等學者 (2002) 根據菸草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 發展出 TRV-based 載體克服此問題，可應用於多種植物，如：番茄與菸草等的研究，適用感染廣泛的植物宿主且不會產生病徵，且可成功達到整株植物皆有靜默效果，而且此載體是目前普遍使用的 VIGS 載體 (Liu et al., 2002)。

VIGS 提供了一個全新的研究基因功能性的實驗方法，有別於傳統化學誘變或轉位子插入等造成突變，VIGS 之優點包括：一、短暫且快速；二、可大量作為基因篩選的方式；三、克服基因家族的基因冗餘性 (redundancy)，可以將片段設計高保守性區域，同時靜默所有基因家族成員；四、VIGS 的實驗模式可以允許進行不

同物種間快速的基因功能性互相比較；五、VIGS 也可以同時在單一物種的不同遺傳背景進行快速的基因靜默，可研究在不同 genotype 之間，其相同基因突變後關係 (Burch-Smith et al., 2004)。

近年來，VIGS 技術平台已被廣泛使用在植物基因研究，目前普遍使用的 TRV-VIGS 系統被應用於植物抗病的研究，例如文獻指出，將番茄荷爾蒙水楊酸、乙烯以及 MAPK 相關途徑的關鍵基因靜默後，會導致番茄抗青枯病能力降低，也證實在番茄中對抗青枯病同時牽涉多種路徑調控植物防禦反應 (Chen et al., 2009)。此外，靜默 TRV-*HSP90* (heat shock protein 90) 的阿拉伯芥植株會使其遭受 *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* 感染程度更加嚴重，結果顯示這些基因參與植物抗病反應且為正調控角色 (Lu et al., 2003)；反之，R 蛋白 (*RIN4*) 基因靜默後，反而增加植物抗病原菌的防禦能力，顯示 *RIN4* 可能扮演負調控者 (Cai et al., 2006)。另一方面，VIGS 也被應用在研究植物對抗乾旱逆境反應的功能研究，將菸草中特定基因 *F3OGT* (Flavonol 3-O-glucosyltransferase)、*ADH* (Alcohol dehydrogenase) 與 *HSP70* (heat shock protein 70) 進行靜默，發現對於抗旱能力降低 (Senthikumar et al., 2007)。由以上文獻可證明，透過 VIGS 系統確實可篩選出重要的植物防禦基因，應用這類基因來增進番茄或其它作物之抗病或耐旱性。不過，利用 VIGS 的系統進行實驗也可能會有以下的顧慮，例如：一、VIGS 作用是短暫的且會隨時間而漸漸消失；二、如果 VIGS 的效率不佳時，可能造成的實驗結果會不顯著；三、VIGS 本身利用重組病毒表達 RNAi 的技術，病毒本身的產物或許會影響植物的生長；四、VIGS 可能會產生非單一基因 VIGS 的 co-silencing 現象，增加造成實驗變因 (Burch-Smith et al., 2004)。儘管如此，VIGS 系統的運用確實可以大幅增加研究的效率，有效幫助植物科學的研究進展。

8. 研究動機與目標

目前研究植物與青枯病菌的交互作用，仍以阿拉伯芥研究為多數，且番茄對青枯病反應的分子機制並不同阿拉伯芥 (Lin et al., 2008)，因此更需研究番茄防禦青枯病的調控機制。先前實驗室研究顯示，在抗青枯病品系 Hawaii 7996 (H7996) 將 *SIERF3* 基因短暫靜默後，造成抗病品系能力下降 (附錄一)，推測 *SIERF3* 基因可能於番茄對抗青枯病中扮演重要角色 (Chen et al., 2009)，且由於青枯病之病

徵伴隨植物缺水逆境形成。因此，本論文研究主要以 *SIERF3* (屬於 ERF B1a 基因群 或 group VIIIa) 胺基酸序列為模板比對到五個相似的番茄同源基因成員，分別命名為 *SIERF B1a-1,-2,-3,-4,-5*，透過一系列植物抗病害與非生物逆境的實驗，探討 *SIERF B1a* 基因群對植物遭受環境逆境可能扮演之角色功能。



第二章 材料與方法

1. 植物材料簡介

本研究主要之植物材料以番茄抗青枯病品系 Hawaii 7996 (BW resistant H7996) 與感病品系 L390 (BW susceptible) 為主，由亞洲蔬菜研究發展中心 (Asian Vegetable Research and Development Center) 的王肇芬老師提供。種子萌發前處理，以震盪 (shaking) 方式培養兩天，目的使其發芽均一化。將已萌根的種子，種植於 2.5 英吋花盆，含蛭石：珍珠石：泥炭土比例為 1：1：1 之培養土中，將其放置於 12 小時光照 25°C，12 小時黑暗 25°C，相對溼度 (humidity) 75% 的人工光照室中培養。基因轉殖的植物主要以茄科植物的菸草品系 *Nicotiana benthamiana*，種植於無菌的 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 的組織培養室。

2. 基因選殖常用實驗

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

PCR 反應之總體積為 50 μL ，內含反應物為 2.5 mM dNTP mixture、10 μM forward primer、10 μM reverse primer、1 \times PCR buffer、1U DNA Taq polymerase 及 100 ng cDNA template。PCR 反應條件為 94°C 5 分鐘，黏合溫度 (Annealing temperature) 94°C 30 秒，(primer T_m 值°C)，延長溫度 (Extension temperature) 72°C X 秒 (視擴增片段大小而定)，經 30 個循環後以 72°C 7 分鐘結束反應。

Polymerase Chain Reaction	
Component	Amount (μL)
cDNA (100 ng)	8
Forward primer, 10 μM	1
Reverse primer, 10 μM	1
10X PCR Buffer	5
dNTP mixture, 2.5 mM	5
Taq Polymerase, 5U/ μL	0.2
ddH ₂ O	Add to final volume of 50 μL

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

利用電泳實驗分離之 DNA 片段，依其大小決定瓊脂糖凝膠濃度，製作瓊脂糖凝膠 (agarose)，首先，秤取適量克數之瓊脂糖凝膠，加入適量體積 0.5 倍 TBE 緩衝液 (Tris-borate-EDTA buffer)，以微波方式加熱溶解成液狀，待溫度稍冷卻後即可鑄模。如欲製作內染膠，即依每 10 mL 瓊脂糖溶液加入 0.1 μ L EtBr (Ethidium bromide) stock 濃度為 50 mg/mL 的比例，待溫度稍冷卻後搖勻後倒入膠片鑄模。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 transilluminator box 檢視分離條帶的位置與亮度。

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

本實驗使用 Gene-spin™ miniprep purification kit-V² 商業套組 (PROTECH 公司) 進行微量質體抽取製備。首先，將單一菌落 (single colony) 放入含抗生素的培養液 (本實驗主要以抗 spectinomycin 抗生素的 pCR8 載體以及抗 kanamycin 和 ampicillin 的 pCRII 載體，作為 TA cloning 的載體)，於 37°C 震盪隔夜培養 16 個小時後，首先，取 1.5 mL 菌液以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉上清液，第一步加入 200 μ L solution I 懸浮菌團，再加入 200 μ L solution II，上下緩慢搖晃 5 至 6 次使其均勻，此步驟為破壞細胞結構，最後加入 300 μ L solution III 均勻混合後，以 13,000 rpm 離心 15 分鐘，此步驟使以酸鹼中和方式凝聚細菌細胞殘骸，之後取出其上清液至商業套組所提供的特殊離心過濾管柱，避免取到細胞殘骸，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將 DNA 留在特殊離心濾管的膜上，將濾液倒掉後加入 700 μ L wash buffer 清洗特殊離心濾管，離心後再次去除下層濾液再以 13,000 rpm 離心 3 分鐘，再以 60°C 使膜上 wash buffer 揮發，避免酒精影響質體的品質，最後加入 50 μ L ddH₂O 回溶質體 DNA，離心後得到欲分離之質體，可用於酵素剪切反應以及定序。

2.4 TOPO® cloning (Invitrogen)

利用 PCR 擴增 VIGS (Virus-induced gene silencing) 使用之基因片段，*SIERF-B1a* 開放轉譯框架 (open reading frame, ORF)。將 PCR 擴增後的目標 DNA，利用 TA cloning 原理構築於 pCR8®/GW/TOPO® 以及 pCR®II-TOPO® 載體，每次 TA cloning 反應的條件為下表，於室溫中進行反應 30 分鐘至一小時，結束後放置於冰上即可進行熱震盪轉型作用。

TA clone reagent	Chemically competent <i>E. coli</i> transfection
Fresh PCR product	0.5~4.5 μL
Salt Solution	1 μL
TOPO® Vector (pCR8®/GW/TOPO® 或 pCR®II-TOPO®)	0.5 μL
ddH ₂ O	to a final volume of 6 μL
Total volume	6 μL

2.5 LR recombination (Invitrogen)

本實驗使用 Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix 商業套組 (Invitrogen 公司) 進行載體 LR recombination 製備。本研究使用 pCR8®/GW/TOPO® vector 進行同源重組互換 (homo-recombination) 至 VIGS 實驗之 TRV (tobacco rattle virus) vector；以及重組互換到短暫表現綠色螢光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 的載體，分別為 GFP 融合 (phusion) 在目標蛋白的 N 端表現的 p2FGW7 以及 GFP 融合在目標蛋白的 C 端 p2GWF7 載體，應用在觀察目標蛋白於植物細胞短暫表現位置的載體。LR recombination 的反應條件為：entry vector (50-150 μg) 1-7 μL 、目標載體 destination vector (150 μg) 1 μL 、0.5 μL 5×LR Clonase™ II enzyme mix，最後以 TE buffer (pH 8.0) 補至總體積 8 μL 。混勻後於室溫 (25°C) 反應一個小時後，最後需要加入 1 μL proteinase K 溶液並置於 37°C 10 分鐘，目的為停止 LR recombination 的反應。

LR recombination components	Amount (μL)
Entry clone (50-150 ng)	1-7 μL
Destination vector (150 ng/ μL)	1 μL
5×LR Clonase™ II enzyme mix	0.5 μL
TE buffer, pH 8.0	to a final volume of 8 μL

2.6 限制酵素之水解作用(Digestion)

其作法如下：取 5 μL 的質體 DNA 或純化過之 PCR 產物，加入 0.5 μL 的 *Pvu*II (10U/ μL)、5 μL 的 10X NEBuffer (1.5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 7.9) 以及 ddH₂O，加至最後體積 50 μL ，混合均勻後加入管內，於 37°C 反應兩小時，進行切割作用之 DNA，再取 2 μL 進行 1% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100V/30 分鐘)，以確定基因之大小長度是否為正確。

Restriction enzyme digestion	
Component	Amount
DNA (plasmid or purified PCR product)	5 μL
10X NEBuffer	5 μL
10X BSA, 1 mg/mL	5 μL if necessary
Restriction enzyme	3-5 units
ddH ₂ O	Add to final volume of 50 μL

2.7 載體與基因之接合作用 (Ligation)

本研究轉殖基因用的構築，進行載體與基因之接合作用，利用接合酶 (T4 DNA Ligase) (Promega, U.S.A) 接合。作法為取 30 ng 的 DNA，加入 2 μL 的 10X T4 DNA ligase buffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol)，100 ng pCAMBIA1300 載體，1 μL T4 DNA ligase (3U/ μL)，最後以去離子水 ddH₂O 補至最後體積 20 μL ，反應於 4 或 16°C 隔夜反應 16 小時，列表如下。

DNA ligation	
Component	Amount
Purified digested vector DNA	> 100 ng
Purified digested insert DNA	\geq 30 ng
10X T4 DNA ligase buffer	2.0 μL
T4 DNA ligase, 1 U/ μL	1 μL
ddH ₂ O	Add to final volume of 20 μL

The reaction was incubated at 16°C overnight.

2.8 大腸桿菌勝任細胞之熱震盪轉型作用 (heat-shock)

將大腸桿菌 DH5 α strain 的勝任細胞與目標質體 DNA 混合，置於冰上 30 分鐘後以 42°C 水浴方式，進行熱震盪 (heat shock) 45 秒處理，目的將細菌細胞膜打開，使質體 DNA 進入菌體內，處理後立即將勝任細胞置於冰上 3 分鐘，使細胞膜關閉，接著加入 900 μ L SOC 培養液，以 37°C 進行生理活性修復功能，再將勝任細胞放入 37°C 生長箱搖晃培養 1 小時，培養後以 6,000 rpm 離心 2 分鐘沉澱大腸桿菌，倒掉多餘培養液後留下約 100 μ L 培養液懸浮大腸桿菌，塗抹於含抗生素的 LB 固體培養基，培養於 37°C 生長箱。

2.9 農桿菌電穿孔法(electroporation)

電穿孔法就是透過電擊農桿菌的方式，使其產生暫時性通透孔使載體進入，自 -80°C 冰箱取出農桿菌勝任細胞放置冰上 (VIGS 實驗使用 GV3101 strain；轉殖實驗則是使用 LBA4404 strain)，取出後等待約 5 分鐘使其解凍，並加入 2 μ L 質體 DNA，再者，將混合有質體 DNA 的農桿菌勝任細胞液體，放入事先預冷之電極距離 0.2 cm 的細胞電穿孔小管 (cuvette)，使用 MicroPulser (BIO-RAD) 儀器通以 2.5 kV 進行電擊，之後立即加入 1 mL YEP 培養液並將農桿菌放置於 28°C 生長箱搖晃培養 2 小時，以低速 6,000 rpm 離心 1 分鐘，吸去 900 μ L 的上清液，混合剩餘的液體與細胞沉澱，塗抹於帶抗生素之 YEP 固體培養基，於 28°C 下隔夜培養 16 小時。

3. 植物 RNA 萃取

3.1 RNeasy Mini Kit (Invitrogen)

將收取 0.1 克的植物組織，放入研鉢內並加入適量液態氮，以研杵研磨組織至粉末狀，將粉末移至 1.5 mL 的微量離心管，事先已加入 445 μ L buffer RLT 及 5 μ L β -mercaptoethanol 混合液體，混合均勻後於 56°C 處理 3 分鐘，處理後的細胞裂解液移至 QIAshredder 離心管柱 (Qiagen, Hilden, Germany 商業套組)，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，吸取通過 QIAshredder 離心管柱的澄清液，再將其置入無 RNase 的乾淨微量離心管，並且加入 250 μ L 100% RNA 專用酒精，混合均勻後將樣本放入 RNA 專用的微量離心管，購至 RNeasy Plant Mini Kit 商業套組 (Qiagen, Hilden, Germany) RNeasy spin column，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後，去除通過 column 的澄清物，利用 700 μ L RW1 緩衝液清洗 RNeasy spin column，

離心後去除 RW1 緩衝液，再加入 500 μL RPE 緩衝液清洗兩次，兩次離心後去除 RPE 緩衝液，最後再以 13,000 rpm 短暫離心 2 分鐘去除 column 中殘餘的含有酒精成分 RPE 緩衝液，將清洗後的 RNeasy spin column 置入無 RNase 新的微量離心管，加入 30~50 μL DEPC 水，以 13,000 rpm 短暫離心 1 分鐘，即可得 RNA 樣本。

3.2 Trizol method

收取 1g 植物組織，利用適量液態氮，以研鉢及研杵研磨至粉末，將粉末放入 50 mL 離心管，加入 15 mL TRIzol 試劑，混合均勻並置於室溫下 30 分鐘，再加入 3 mL chloroform，反轉離心管混勻後，以 4°C 10,000 rpm 離心 20 分鐘，將上層上清液置入新的 50 mL 離心管，加入 12 mL 異丙醇冰入 -80°C 冰箱。過夜後以 10,000 rpm 離心 20 分，去掉上清液後將離心管放入抽風櫥，待殘餘異丙醇揮發後加入 400 μL DEPC 水，RNA 回溶後放入新的 1.5 mL 微量離心管，加入 800 μL phenol: chloroform (1:1)，混合均勻後以 4°C 13,000 rpm 離心 15 分鐘，吸取上層上清液約 200 μL ，分裝至兩管新的 1.5 mL 微量離心管並加入 3M 醋酸鈉 30 μL 以及 1 mL 100%酒精，冰入 -80°C 冰箱，一管樣本作長期保存，另一管待過夜後以 4°C 13,000 rpm 離心 20 分，去除上清液後沉澱物以 75% 酒精清洗兩次，待殘餘酒精揮發後以 200 μL DEPC 水回溶。

3.3 DNase treatment

本研究的 RNA 進行 DNase treatment 是使用 RNase-free DNase I (Promega, Madison, WI) 商業套組，DNase treatment 的總體積為 50 μL ，其反應物為 5 μg 的 RNA，加入 5 μL DNase 酵素、5 μL RNase-free DNase 10X buffer，補 DEPC 水至 50 μL ，於 37°C 處理 1.5 小時，反應完後，於反應物中再補 DEPC 水至 200 μL ，加入 200 μL RNA 專用的 phenol:chloroform (比例為 1:1)，混合均勻後，以 4°C 13,000 rpm 離心 20 分鐘，目的使其去除影響 RNA 的雜質，將分兩層之上層上清液 200 μL 取出至乾淨的 1.5 mL 無 RNase 微量離心管，加入總體積 1/10 的 3 M 醋酸鈉 (pH 5.3) 及等體積的 100% RNA 專用酒精，混合均勻後，置於 -80°C 靜置沉澱，以 4°C 13,000 rpm 離心 30 分鐘，再用 75% 酒精清洗 RNA，快速離心去除酒精後，用 30-50 μL DEPC 水回溶 RNA，RNA 濃度是以全光譜微量分光光度分析儀 (NanoDrop, ND-1000) 測量 A_{260}/A_{280} 的比值而得。

DNase treatment components	Amount (μL)
RNA (5 μg)	視 RNA 濃度而定
RNase-free DNase 10X buffer	5 μL
DNase	5 μL
DEPC-H ₂ O	to a final volume of 50 μL

4. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

本實驗使用的反應試劑為購買 Promega 公司的 Reverse Transcription System (Cat.#3500) 商業套組。利用植物帶有 poly (A)+ tail 的 mRNA 生化特性，進一步利用 Oligo (dT)₁₅ 當作引子，合成 cDNA。實驗方法如下，首先取 0.5~1 μg 的 total mRNA，補 DEPC-H₂O 至 10.2 μL ，先以 70°C 加熱 10 分鐘後，放置於冰上短暫 3 分鐘，接著加入事先配置好的混合反應物 (cocktail)，cocktail 包含: 2 μL 的 dNTP mix (10 mM)、2 μL 的 10X reverse transcription buffer、1 μL 的 Oligo (dT)₁₅ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、4 μL 的 MgCl₂ (25 mM)、0.4 μL 的反轉錄酶 Avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (15U/1 μL) 及 0.4 μL RNA 抑制劑 recombinant RNasin ribonuclease inhibitor，反應的總體積為 20 μL ，混合均勻後，於反應溫度 42°C 進行 1.5 小時合成 cDNA，最後以 95°C 加熱 5 分鐘後停止反應，合成的 cDNA 補乾淨的 ddH₂O 至總體積 80 μL 後保存於 -20°C 備用。

Reverse transcription	
Component	Amount (μL)
MgCl ₂ , 25 mM	4.0
10X Reverse Transcription Buffer	2.0
dNTP mixture, 10 mM	2.0
Recombinant RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor	0.4
AMV Reverse Transcriptase (15U/1 μL)	0.4
Oligo(dT) ₁₅ Primer (500ng/1 μL)	1.0
Pretreated RNA plus DEPC-H ₂ O	10.2

4.1 半定量 RT-PCR (Semi-quantitative RT-PCR)

實驗的作法如下，半定量 PCR 之總反應體積，含 8 μL Template cDNA (100 ~200 ng) 溶液、1 μL forward primer (10 μM)、1 μL reverse primer (10 μM)、4.9 μL Reverse Transcription 10 \times buffer、3.75 μL MgCl_2 (25 mM)、0.36 μL dNTP mixture (25 mM)、0.15 μL Taq polymerase (Bio-East, 2U/ μL)，其餘體積以去離子水 ddH₂O 補至 50 μL 。根據 DNA 片段大小及引子 T_m 溫度，設定 PCR 反應之條件，於 PCR 擴增反應第 20、24、27、30、35、40 個 cycles 時各收取 5 μL 樣本，利用帶有 EtBr 的 1% (w/v) 瓊脂凝膠，進行電泳分析 (100V/30 分鐘)。

Semi-quantitative RT-PCR	
Component	Amount (μL)
Template cDNA (100 ~200 ng)	8 μL
Forward primer (10 μM)	1 μL
Reverse primer (10 μM)	1 μL
MgCl_2 , 25 mM	3.75 μL
10X Reverse Transcription Buffer	4.9 μL
dNTP mixture, 10 mM	0.36 μL
Taq polymerase (Bio-East, 2U/ μL)	0.15 μL
ddH ₂ O	to a final volume of 50 μL

Semi-quantitative RT-PCR program			
Cycling step		Temperature & time	
First	Initial denaturation	5 min at 95°C	
	Denaturation	10 sec at 95°C	20 cycles
	Annealing	30 sec at 55°C	
	Extension	30 sec at 72°C	
	Pause	16°C	
Second and follow-up	Denaturation	10 sec at 95°C	<u>N</u> cycles
	Annealing	30 sec at 55°C	
	Extension	30 sec at 72°C	
	Pause	16°C	

4.2 即時定量 Real-time PCR

本實驗為使用溫度梯度核酸即時定量偵測系統 (Bio-Rad Real-Time PCR Detection Systems, 型號 BIO-RAD MyiQ™), Real-time PCR 反應試劑則是購買 KAPA SYBR® qPCR Kit (Universal, ABI Prism®, Bio-Rad iCycler™, or Roche LightCycler™ 480)。實驗前必須先進行 No Template Control (NTC) 測試, 確認是否有 primer dimmer。本研究之實驗反應總體積為 18 μL , 實驗方法如下, 首先 cDNA 稀釋為 15 ng/ μL 後取 8 μL , 加入事先配置好的 cocktail, 內含有 9 μL 2x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix, 0.5 μL 的 forward primer (10 μM), 0.5 μL 的 reverse primer (10 μM), 混合均勻後放入 Real-Time PCR 反應器中進行 PCR 反應, 再以 Bio-Rad 研發之 iQ™5 Optical system version 2.0 版軟體, 進行分析。

Real-time PCR (qPCR)	
Reaction Component	Amount (μL)
Template cDNA (100 ~200 ng)	8 μL
Forward primer (10 μM)	0.5 μL
Reverse primer (10 μM)	0.5 μL
2x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	9 μL
Total volume	20 μL

Real-time PCR program			
Cycling step		Temperature & time	
Hot start	Initial denaturation	3 min at 95°C	
PCR	Denaturation	10 sec at 95°C	40 cycles
	Annealing	30 sec at 55°C (視 primer 而定)	
Melting curve	1 min at 95°C		81 cycles
	1 min at 55°C		
	10 sec at 95°C		

5. 抽取植物 DNA

快速抽取法, 首先配製 DNA 萃取緩衝溶液如下: 200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS。以 TE buffer 10 倍稀釋 DNA 萃取緩衝溶

液後，放入微量離心管並加入 3-5 mg 植物葉片組織，利用小型研磨棒將葉片組織磨碎後，避開破碎的組織吸取 1 μ L 萃取後的液體，即可用於一般 PCR。

CTAB 萃取方法如下，液態氮研磨 1-2g 植物組織，加入 1 mL 2X CTAB 萃取液(100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2% CTAB: mixed-alkyltrimethyl-ammonium bromide, 700 mM NaCl, 20 mM EDTA (pH 7.5), 1% β -mercaptoethanol, 1% sodium bisulfite)，混合均勻，置於 60°C 反應 30 分鐘，過程中混和數次。待溫度冷卻後，加入 1 mL chloroform:isoamylol (24:1) 均勻混合，以 5,000 rpm 離心 10 分鐘，取其上清液至新的離心管，再加入 1 μ L RNase (10 mg/mL)，於 37°C 反應 1 小時。加入 1 mL -20°C isopropanol 均勻混合後，短暫離心去除上清液，之後再加入 1 mL 76% EtOH/0.2 M Na Acetate，置於室溫下 20 分鐘，之後以 5,000 rpm 短暫離心，去除上清液，最後再加入 1 mL 76% EtOH/10 mM NH₄ Acetate，以 5,000 rpm 短暫離心，去除上清液，待酒精完全揮發後，用去離子水回溶 DNA。

6. 短暫性病毒誘導性基因靜默(Transient virus-induced gene silencing, VIGS)

將期望靜默之目標基因以 PCR 方式擴增特定專一片段，所設計用來靜默的片段最佳大小約 300 bp，最佳基因靜默的區域，是於 5' 端未轉錄區 (5'untranslated region)，可以避免靜默到高度保留性的基因片段。將特定靜默片段利用 LR recombination 方式裝載於 pTRV2 載體，並進一步轉型入農桿菌 GV3101 strain。把各個攜帶有 TRV RNA1 (pTRV1) 或 TRV RNA2 (pTRV2) 載體並裝載目標基因片段的農桿菌培養在 3 mL YEP medium (包含 50 μ g/mL kanamycin, 50 μ g/mL gentamycin, 25 μ g/mL rifampicin)，隔夜培養 16 小時，再將農桿菌放大培養在帶有抗生素與 10 mM MES 以及 20 mM acetosyringone (AS) 的 25-mL YEP 中放大培養，培養第三天後，3,000 rpm 室溫離心，去除上清液之後以培養液(10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 200 mM acetosyringone, pH5.6) 將帶有 pTRV1 與 pTRV2 裝載目標基因片段或 empty pTRV2 vector 的農桿菌以調整農桿菌濃度為 OD₆₀₀=1.5，pTRV1 與 pTRV2 = 1:1 的比例混合，置於 28°C 培養至少 3 小時後即可利用 1 mL 注射針筒 (without a needle) 將農桿菌注射入生長七天大之番茄子葉，再注射前須先將子葉的中肋以針頭戳一小洞，始操作注射感染的實驗，於每次注射感染後之番茄放置於 16 小時光照/8 小時黑暗 22°C 的生長箱，進行 VIGS 反應。

6.1 病毒誘導性基因靜默 (VIGS) 檢測青枯病菌逆境反應

(1) 番茄澆灌青枯病菌之評估

感染後之番茄放置於 16 小時光照/8 小時黑暗 22°C 的生長箱，等待 10 天後進行青枯病菌接種。抗病品系 H7996 則是澆灌 OD₆₀₀=0.6 (2×10⁸ CFU/mL) 的菌量 25 mL；感病品系 L390 則是澆灌 OD₆₀₀=0.03 (5×10⁵ CFU/mL) 的菌量 25 mL，青枯病菌品系 Pss4 從 -80°C 冰箱劃於 TTC 固體培養基上，28°C 培養兩天後以 3 mL 523 培養液於 28°C 200 rpm 培養一天，再將菌液塗於 523 固體培養基於 28°C 培養一天。利用無菌水將青枯病菌自培養基洗下，調整懸浮菌液濃度，直接澆灌 25 mL 菌液於培養著斷根的番茄土盆中。觀察植物接菌後之外表形變化，並於接菌後第五天，截取從子葉以上及以下 0.5 公分處，再往兩處取 1 公分長度的番茄莖基部與莖部，測量重量後分別加入 1 mL 之無菌水以研杵搗碎，吸取 100 μL 組織萃取液以無菌水作序列稀釋後，從各個序列稀釋的樣本中吸取 10 μL 樣本點至半篩選盤 SM1 培養基 (Lin *et al.*, 2008) 並培養於 28°C 生長箱，兩天後記錄青枯病菌之菌落 (colony) 生長情況。青枯病菌量的濃度是利用 SAS Proc Mixed (SAS Institute) 作統計分析，以 Student's *t*-test 統計確認是否有顯著差異，培養基成分列出於附錄 (附錄二十一)。

(2) 番茄青枯病之病徵發展萎凋級數 (wilting score) 分析

此實驗主要以感病品系 L390 進行 VIGS 檢測青枯病菌逆境反應之實驗，藉由逐日觀察接種後植物番茄青枯病病徵發展，及其外表性狀的萎凋變化情形，以萎凋程度給予萎凋級數 (wilting score) 進行量化分析，根據病徵分級系統給與客觀的評比。

Wilting score	Description of symptom development
0 level	葉子皆無枯萎現象，即無病徵
1 level	1 片葉子枯萎
2 level	2 至 3 片葉子枯萎
3 level	除頂芽以外其餘葉子皆枯萎
4 level	全株葉子皆枯萎
5 level	整株植株莖桿折斷枯萎死亡

6.2 病毒誘導性基因靜默 (VIGS) 檢測乾旱逆境

因青枯病於植物所造成的生理萎凋現象與水份輸送受阻的關聯性極大，因此實驗主要想利用 VIGS 的方式進行乾旱逆境的研究，此實驗參考 Senthil-Kumar (2008) 研究方法，VIGS 感染後之番茄放置於 16 小時光照/8 小時黑暗 22°C 的生長箱，等待 15 天後，依據 positive control 的 *PDS* (phytoene desaturase) 基因靜默後的植物外表型 (phenotype) 之白化出現與否，決定是否開始給予乾旱缺水逆境，因為 *PDS* 為葉綠素 (chlorophyll) 合成的重要關鍵酵素，因此將其進行基因靜默後，於植株因為無法正常合成葉綠素，而有葉片白化的表現型，也因為觀察到白化外表型，代表著此時植株整體因病毒載體具系統性傳遞特性，達整體皆具有 VIGS 靜默的效果，此時進行乾旱逆境的處理為最佳效果，本實驗利用於 VIGS 十五天後觀察到白化外表型，開始斷水處理 (holding irrigation)，後續進行外表型的觀察以及與缺水逆境 (water deficit) 相關的量化參數，並且於 VIGS 十五天收取兩棵 VIGS 番茄之根、莖基部 (stem-base)、莖 (stem) 之樣品以 -80°C 保存，做為半定量 RT-PCR 檢測 VIGS 靜默特定基因效率之用。

(1) 乾旱之萎凋級數 (wilting score) 分析

由於青枯病與植物的交互作用，與其所造成的生理萎凋現象與水份輸送受阻有關，因此實驗主要以抗病品系的 Hawaii 7996 進行 VIGS 檢測乾旱逆境反應之實驗，藉由逐日觀察接種後植物遭受乾旱逆境時的生長發展，及其外表性狀的因為乾旱而萎凋變化的情形，以乾旱萎凋程度給予乾萎級數 (drought wilting score) 進行量化分析，根據乾旱程度分級並且給與客觀評比。

Wilting score	Description of drought development
0 level	葉子皆無乾枯現象
1 level	1 片葉子乾枯
2 level	2 至 3 片葉子乾枯
3 level	除頂芽以外其餘葉子皆乾枯
4 level	全株葉子皆乾枯
5 level	整株植株乾枯死亡

(2) 葉綠素含量測量

收取植株地上部，以微量天平秤取重量，將植物組織放在研鉢中並倒入液態氮磨成粉末，依照 1 g 組織加入 10 mL 80% 丙酮的比例加入丙酮，混合均勻並在室溫下作用十分鐘，接著以 4°C 10,000 rpm 離心五分鐘，取上清液測其 663 nm 與 645 nm 之吸光值，將所得數據以 Arnon 1949 的公式進行計算如下。

$$\begin{aligned} \text{每克鮮重葉片中所含葉綠素總量 (mg/g)} &= \text{葉綠素 a} + \text{葉綠素 b} \\ \Rightarrow \text{葉綠素 a (mg/g)} &= [12.25 (A_{663.6}) - 2.55 (A_{646.6})] \times \frac{V}{1000 \times W} \\ \Rightarrow \text{葉綠素 b (mg/g)} &= [20.31 (A_{646.6}) - 4.91 (A_{663.6})] \times \frac{V}{1000 \times W} \end{aligned}$$

V 為 80% 丙酮萃取液之體積 (mL)、W 為葉片鮮重 (g)

7. 番茄不同組織樣品之收取

主要以番茄天然抗青枯病品系 Hawaii 7996 的組織為主，本研究收取的部位主要以生長一個禮拜的子葉 (Cotyledon)、三個禮拜成熟植株的根 (Root)、莖基部 (Stem-base)、莖 (Stem)、真葉 (Leaf)、六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八個禮拜未成熟的綠果以及三個月成熟的紅果 (immature green fruit / mature red fruit)。

8. 番茄以真空吸引浸透法 (vacuum-infiltration) 接種青枯病菌之樣品製備

植物材料以番茄天然抗青枯病品系 Hawaii 7996 與感病品系 L390 為主，首先，將種子浸泡於乾淨水質中，以震盪方式培養兩天。前處理後，將種子種植於 2.5 英吋花盆，含蛭石：珍珠石：泥炭土(1：1：1) 之培養土中，將其放至於 12 小時光照 25°C，12 小時黑暗 25°C，溫室生長培養三周，亦即五片葉齡的成熟番茄植株，準備將 OD₆₀₀=0.03 (1×10⁶ CFU/mL) 之青枯病菌菌株 Pss4，懸浮於含 0.005% 展著劑 (Silwet) 之去離子水懸浮液，對照組只含 0.005% Silwet 之去離子水。處理方式為將番茄植物倒置於青枯菌懸浮液計數 10 秒後，接著將沾有菌液的植株放置於真空抽氣機內，以 500 毫米汞柱 (mmHg) 的壓力進行真空吸引浸透，真空時間為兩分鐘，此時植物葉片將整片浸透菌液，收取真空吸引浸透後的 0、1、2、4、8、12、24 小時後之番茄第三、四、五片真葉的組織，以液態氮瞬間冷凍後保存於 -80°C 冰箱備用。

9. 番茄處理植物荷爾蒙乙烯 (ET)、水楊酸 (SA)、茉莉酸 (JA)、離層酸 (ABA)

(1) 番茄處理乙烯氣體濃度 10 ppm 的方法，如下：

首先，將 2 小盆 H7996 番茄植株放入 9.4 升的壓克力呼吸缸內，接著利用通過乙烯吸收劑的高壓空氣充入呼吸缸換氣約 30 秒，之後將上蓋蓋上並用膠帶密封 9.4 升的呼吸缸，進一步用 50 mL 的塑膠針筒抽取缸內 100 mL 氣體出來，然後注入原始濃度 1000 ppm 的乙烯氣體 100 mL 進入呼吸缸內 ($100 \text{ mL}/10 \text{ L} \times 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$)，使缸內濃度呈 10 ppm，大約 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) 以測定分析乙烯濃度，確認缸內濃度。

(2) 番茄處理水楊酸濃度 2 mM 的方法，如下：

以 100% 酒精配製 1 M 水楊酸，再以無菌的去離子水稀釋成 2 mM 水楊酸。將 2 mM 水楊酸均勻噴灑在三周大番茄 H7996 品系的葉子，收取 0、1、2、4、8、24 小時後之番茄第三、四、五片真葉的組織，每個時間點各收取兩棵，0 小時為不處理水楊酸的番茄作為對照組。

(3) 番茄處理茉莉酸濃度 0.1 mM 的方法，如下：

以 100% 酒精配製茉莉酸為濃度 100 mM，再以無菌的去離子水稀釋成 0.1 mM 茉莉酸。將 0.1 mM 茉莉酸均勻噴灑在三周大的番茄 H7996 品系的葉子，收取 0、1、2、4、8、24 小時後之番茄第三、四、五片真葉的組織，每個時間點各收兩棵，0 小時為不處理茉莉酸的番茄作為對照組。

(4) 番茄處理離層酸濃度 0.1 mM 的方法，如下：

以 100% 酒精配製離層酸為濃度 100 mM，再以無菌的去離子水稀釋成 0.1 mM 離層酸。將 0.1 mM 離層酸均勻噴灑在三周大的番茄 H7996 品系的葉子，收取 0、1、2、4、8、24 小時後之番茄第三、四、五片真葉的組織，每個時間點各收兩棵，0 小時為不處理離層酸的番茄作為對照組。

10. 番茄乾旱處理之樣品製備

本研究利用 3 至 4 個禮拜 H7996 成熟番茄植株進行乾旱處理，將處理的方式分為 5 個時間點收取，首先，將植株在土壤水分飽和情況之下，停止給水灌溉即開始進行乾旱，在乾旱後的第二天，混合收取兩棵植株的莖基部組織，之後進行第一次回水，在回水後的第 6、12 與 24 個小時，在此三個時間點，相繼混合收取兩棵植株的莖基部組織，最後，在第一次回水後的第 24 個小時，再進行第

二次回水，最後一個時間點為收取經二次回水並且過 24 個小時後的組織，進一步將 5 個時間點分別抽取 RNA 後反轉錄為 cDNA 進行檢測。

11. 蛋白質定位分析 (sub-cellular localization)

利用生物資訊方法，預測該基因轉譯之蛋白質於植物細胞中可能表現位置，進一步將基因構築在帶有綠色螢光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 報導基因載體上，藉由 PEG 轉型作用將構築帶有目標基因的載體送入阿拉伯芥細胞內，於原生質體作基因短暫表現 (transient expression)，藉由這些報導基因的表現，可觀察到該基因蛋白於細胞中的表現位置。

11.1 阿拉伯芥原生質體 (protoplast) 之分離

樣品取自生長於短日照 (10 小時日照/14 小時黑暗) 三至四周之阿拉伯芥葉片 (營養生長期)，利用解剖刀將葉片縱切數刀後，浸泡在裝有酵素溶液的培養皿中，於室溫下 50 rpm 緩慢搖動 3 個小時後，吸取培養皿中含有原生質體的溶液到乾淨的圓底離心管中，以 900 rpm 離心 2 分鐘，去除酵素溶液後加入 5 mL W5 緩衝液，以滴管輕微的清洗，總共兩次，目的為將原生質體的表面酵素洗滌乾淨，避免影響細胞的品質，第三次以 5 mL W5 緩衝液再次懸浮原生質體，並以血球計數器計算細胞數量，決定原生質體的濃度。此時將原生質體放置冰上 30 分鐘，使其自然沉降後，再將 W5 緩衝液移除，並依其最後實驗用的細胞濃度，進一步決定 MMg 緩衝液懸浮原生質體所加入的體積，輕微的懸浮細胞後置於室溫即可進行後續的實驗，緩衝液成分列出於附錄 (附錄二十一)。

11.2 PEG 轉染 (transfection) 作用

利用 Gene-spin™ miniprep purification kit-V² 商業套組 (PROTECH 公司) 進行抽取質體 DNA，將 20 μ L 質體 DNA (20~40 ug) 加入圓底塑膠管中，再加入 200 μ L 以 MMg 緩衝液懸浮之原生質體到圓底塑膠管，最後加入 220 μ L PEG，以手指輕彈圓底塑膠管使細胞與質體混合均勻反應，放置室溫下 7 分鐘後加入 5 mL W5 緩衝液清洗，目的是將 PEG 清除乾淨，避免影響細胞的健康程度，總共清洗三次，清洗後之原生質體最後以 1 mL W5 緩衝液懸浮，用滴管吸出原生質體後，滴於以 1% BSA 處理 30 分鐘的六孔盤中，將原生質體培養於一般日光燈照明下，於室溫中反應 16 至 24 個小時，進行 *in vivo* 的蛋白表現，之後以高解析度活細胞影像系統 DeltaVision Core 觀察及拍攝。

12. 轉錄活性分析法 Transactivation assay

本實驗方法參考 Ohme-Takagi (2008) 的文獻，利用阿拉伯的原生質體，進行 *in vivo* 之轉錄活化分析法 transactivation assay，分析轉錄因子為活化子 (activator) 或抑制子 (repressor)，為評估轉錄因子在細胞內與特定 DNA 序列結合之活性測試。本實驗會利用帶有酵母菌的基因 *GAL4* 進行構築與分析，利用轉染 (transfection) 的方式將帶有 *GAL4* 基因序列的報導載體與具專一的結合蛋白 GAL4DB 的受器載體 (effector) 同時送入細胞中，進一步分析是否兩者之間有交互作用而被活化表現。

12.1 Reporter and Effector plasmids 之構築

進行轉錄活化分析所用的載體構築，本研究所用的報導載體為 UAS_{GAL4}GCC-LUC 其帶有串聯 5 個拷貝數的 *GAL4*-responsive element，串聯 4 個拷貝數的 GCC box sequence，一個 CaMV 35S 啟動子的 minimal TATA 區域 (starting at position -46) 以及能夠發螢光的報導基因 firefly luciferase (LUC)，主要用偵測的螢光激發的活性。Effector plasmids 之構築：本研究的對照組，(1) 35S-GAL4DB-VP16，其具有 *GAL4* DNA binding domain (GAL4DB)，(2) 利用自 herpes simplex virus 選殖到 viral protein 16 (VP16)，其強烈活性的 domain 具有活化轉錄作用 (activating transcription)，而此 GAL4DB-VP16 融合蛋白質 (fusion protein)，會與報導基因上特定之 *GAL4* 結合序列結合作反應；其次，35S-AtERF5 於阿拉伯芥中其亦具有活化轉錄作用的蛋白，此蛋白會與位於報導質體內的 GCC box 有交互作用。另外，本實驗利用 35S-GAL4DB-ERF3RD，此構築特性具有 tobacco ERF3 (*NtERF3*) 第 191 至 225 胺基酸的區域，其為具有抑制轉錄活性的 domain，而此 GAL4DB-ERF3RD 融合蛋白質，會與報導基因上特定之 *GAL4* 結合序列結合作反應，進一步抑制報導基因的表現，作為具有抑制轉錄功能的對照組。

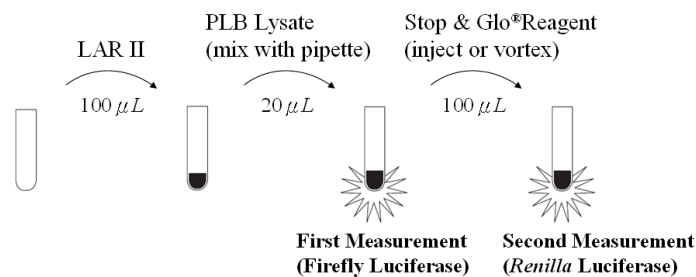
而本研究目標基因群 *SIERF-B1a* 發現亦有與其相同於 C 端有一高度保守性的 repression domain 【L/FDLNL/F(x)P】。進一步將基因構築於 35S-GAL4DB-X (X 代表為 Repressor-type 的 *SIERF-B1a* 基因群) 的表現載體上，其所轉譯出的融合蛋白質與同時被送入細胞中的報導載體 GAL4GCC-LUC 上之 *GAL4* 反應調控子 (5×*GAL4* binding sites) 結合，進而促使其下游的 *Luciferase* 基因啟動，而表現出

Luciferase 的蛋白質酵素活性。

12.2 共轉染之短暫表現 (Cotransfection transient expression)

本實驗的研究方式是將含有 firefly luciferase 基因的報導載體 (reporter) 濃度 1.6 µg、含有目標基因的受器載體 (effector) 濃度 1.2 µg 以及用來作為 internal control 由海腎 (*Renilla reniformis*) 所得的綠色螢光蛋白螢光基因 *Renilla luciferase* 濃度 0.4 µg，將三者以 5:4:1 比例共轉染 (cotransfection) 至阿拉伯芥的原生質體中，經 16 小時隔夜反應後，及可進行螢光活性分析。

螢光活性分析則是購買自 promega 公司的商業套組 Dual-Luciferase[®] Reporter (DLR[™]) Assay System，首先將原生質體收集至 1.5 mL 離心管以 800 rpm 將細胞離心沉澱，除去 W5 的上清液，接著加入 100 µL 1X Passive lysis buffer (PLB) 目的為破細胞，於室溫中反應 15 分鐘後，短暫離心 30 秒移除細胞殘骸，而其上清液即可進行反應。首先，取 100 µL Luciferase Assay Reagent II (LAR II) 於反應管中，接著再加入 20 µL 原生質體，輕微搖晃混合後，立即放入螢光儀 BG-21 偵測讀值，此時將從原生質體打破的蛋白，並給予能發出螢光的 Luciferase 受質，藉由偵測螢光的強度 Luminescence (RLU) 數值，即可反映出目標基因的 effector 活化 reporter 的能力，最後在加入 100 µL 的 Stop & Glo[®] Reagent，目的於偵測 *Renilla luciferase* 的 RLU 數值，最後的實驗結果可經由此兩個螢光讀值進一步計算其每個反應的螢光活性百分比。



Step1	Manually add prepared lysate to Luciferase Assay Reagent II predisposed into luminometer tubes; mix.	3 seconds
Step2	Quantify firefly luciferase activity.	12 seconds
Step3	Add Stop & Glo [®] Reagent; mix.	3 seconds
Step4	Quantitate <i>Renilla luciferase</i> activity	12 seconds
Total elapsed time for the DLR [™] Assay		30 seconds

13. 利用農桿菌 LBA4404 進行菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 轉殖

植物材料為菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 首先將種子以 75% 酒精進行表面消毒至少兩次，每次一分鐘，接著再以 10% 的漂白水，以震盪的方式消毒 15 分鐘，接著以無菌水稀釋清洗種子至少 10 次以上。將消毒過的種子播種在 MS salt 含有 3% 蔗糖 (pH5.7) 及 0.2% gelrite 水晶洋菜培養固體介質中，於 25°C 生長於 12 小時光照及 12 小時黑暗的組織培養室。等待菸草第一對真葉展開後，移至 MS salt 含有 3% 蔗糖 (pH5.7) 及 0.2% 水晶洋菜培養固體介質生長培養，繼代至展開第三對的成熟葉片，即為合適轉殖植物的年齡。

首先，感染葉片的前兩天，挑選 single colony 的農桿菌，在 28°C 環境下進行培養，隔天將菌液離心並去除上清液，以 co-culture 液體培養基重新懸浮細胞將 OD₆₀₀ 值調整至 0.6 至 1 的範圍，接著將成熟葉片避開中肋切成 1 公分見方大小，因為之後葉片會變成較大且厚的癒傷組織，因此在分割葉片時不宜太大片，將菌液倒至培養皿中，接著將切好的葉片靜置於菌液中培養 3 至 5 分鐘，葉片與菌液共培養的時間不宜過久，否則不易將農桿菌清除乾淨，接著將感染的葉片以無菌水清洗 9 至 10 次，清洗後的葉片用滅菌的擦手紙吸乾其葉面之水分，最後將葉片平鋪在 TSM 固體培養基上，進行 2 天的黑暗培養，目的使土壤性農桿菌的感染效果最佳，爾後再將葉片培植體移至含抗農桿菌以及植物的篩選抗生素的 TSM 固體培養基中。之後每個禮拜須進行培植體的繼代，繼代頻率為控制篩選轉殖株的重要因素。大約經過 5 至 6 個星期後，從培植體抽出的芽體，待芽體長大至約 1 至 2 公分，即可切下分離至一般的菸草固體培養基進行發根，待發根後即可移至土盆進行馴化培養，進一步檢測轉殖株的身分以及收取 R1 世代的種子，培養基成分列出於附錄 (附錄二十一)。

14. 植物之逆境檢測

14.1 種子萌發率測試

阿拉伯芥種子以稀釋 10 倍之漂白水消毒後，以 4°C 低溫春化兩天後，目的在於發芽的一致性，分別播種於模擬在非生物逆境下的培養基，分別為鹽分逆境 100 mM、模擬乾旱逆境 7% PEG、模擬滲透壓逆境的 0.2 M Mannitol、模擬糖分逆境的 4% glucose、0.3 μM ABA 之 1/2 MS 固體培養基，爾後將種子生長於 25°C 溫度及 12 小時光照與 12 小時黑暗的組織培養室，藉以觀察模擬各式非生物逆

境之環境測試其種子之萌發率。

14.2 幼苗對於鹽害、滲透壓、PEG 模擬乾旱、氧化逆境及離層酸之根生長測試

於菸草轉植株方面，菸草 R1 世代的種子以稀釋 10 倍之漂白水消毒並播種於 1/2 MS 含有 8 ppm hygromycin 的抗生素固體培養基，於溫度 25°C 及 12 小時光照與 12 小時黑暗，生長 14 天後，將小苗分別移至帶有分別為鹽分逆境 200 mM、模擬乾旱逆境 3% 的 PEG、模擬滲透壓逆境 0.2 M 的 Mannitol、模擬氧化逆境 50 μ M 的 MV 以及 10 μ M ABA 模擬乾旱及滲透壓所牽涉的逆境之 1/2 MS 固體培養基，藉以模擬各式非生物逆境之環境，觀察植株受這些非生物逆境根部延長生長的情形。

14.3 圓盤葉片 (leaf disc) 對於鹽害、滲透壓及氧化逆境之耐受性測試

菸草轉植株對於非生物逆境的測試方面，利用圓盤葉片(leaf disc)方式進行研究，首先亦是將菸草 R1 世代的種子以稀釋 10 倍之漂白水消毒，並播種於 1/2 MS 含有 8 ppm hygromycin 的抗生素固體培養基，於溫度 25°C 及 12 小時光照與 12 小時黑暗，生長 14 天後，在移置土盆生長 14 天，實驗進行時，利用直徑 1 公分的圓形轉孔器，於菸草成株的第四對真葉鑽出直徑 1 公分的圓盤葉片，之後利用直接浸潤方式，將圓盤葉片漂浮於含有鹽害及氧化逆境的水溶液中，並置於溫度 25°C 及 12 小時光照與 12 小時黑暗的培養室進行逆境反應，觀察在這些逆境下葉片的耐受性，以及檢測其葉綠素的含量，藉以模擬成株植物對於此三種鹽害及氧化逆境的耐受性。

14.4 菸草轉植株與阿拉伯芥完全缺失突變體 (null mutants) 成株之乾旱測試

菸草轉植株乾旱實驗方面，將轉植株先於 1/2 MS 含有 8 ppm hygromycin 的抗生素固體培養基篩選兩週後，在移出並種植在同一個土盆中，一個土盆剖半種植 5 個空載體以及 5 個轉植株，移至土盆後兩週，進行停止給水的乾旱逆境，並且針對每一棵菸草逐日記錄其萎凋情況，根據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 level：葉子皆無萎凋；1 level：1-25% 葉片萎凋；2 level：26-50% 葉片萎凋；3 level：51-75% 葉片萎凋；4 level：76-100% 葉片萎凋。

阿拉伯芥完全缺失突變體乾旱實驗方面，將阿拉伯芥完全缺失突變體種植在同一個圓型土盆中 (尺寸為直徑 12 公分及高 10 公分)，避免不同盆有水分含量

差異之不同程度影響，一個土盆剖半種植四週大 4 棵野生型 Col-0 以及 4 棵突變體，每次實驗有兩盆共 8 棵，進行停止給水的乾旱逆境，逐日觀察在同一盆中野生型與突變體，是否有不同程度的乾枯外表型。

14.5 菸草轉殖株與阿拉伯芥完全缺失突變體成株之根部接種青枯病菌測試

菸草轉殖株接菌方面，本研究將菸草 R1 世代轉殖株，先於 1/2 MS 含有 8 ppm hygromycin 的抗生素固體培養基篩選兩週後，在移出並種植於 3 英寸土盆，馴化適應兩週後，及為四週大的菸草轉殖株，進行模擬自然情況之下的根部青枯病菌接種感染實驗，所接種的 *Rs* 菌系為 Pss4，接種菌量為 $OD_{600}=0.3$ 的菌液濃度，每一盆植物澆灌 25 mL 的菌液體積，每次實驗之對照組與實驗組各 12 棵植物，接完菌後逐日觀察其萎凋變化情形，根據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 level：葉子皆無萎凋；1 level：1-25% 葉片萎凋；2 level：26-50% 葉片萎凋；3 level：51-75% 葉片萎凋；4 level：76-100% 葉片萎凋。

阿拉伯芥完全缺失突變體接菌方面，本研究採用 4 週大的植株進行實驗，所接種的青枯病菌選用感染宿主為阿拉伯芥的 Rd15 菌系，接種的條件為 $OD_{600}=0.3$ 的菌液濃度，接種的方式，首先將菌液與培養土以 140 mL 比 700 克的比例，在方型不透水皿中均勻混合，將種植於穴苗盆中的阿拉伯芥進行斷根處理，將植物的根系截斷剩下約 1 公分的根系長度，種植於混合菌液的培養土中，並於同一皿中同時並排種植對照組 Col-0 野生型，接種後的阿拉伯芥移至 26°C 溫度及 12 小時光照與 12 小時黑暗的生長箱，逐日登記並觀察植物萎凋情況，並將阿拉伯芥萎凋分級如下，Level 0：叢生葉 (rosette leaf) 無明顯病徵；Level 1：1~25% 的葉片萎凋；Level 2：26~50% 的葉片萎凋；Level 3：51~75% 的葉片萎凋；Level 4：75% 以上葉片完全萎凋。

14.6 阿拉伯芥接種軟腐病菌 (*Pectobacterium chrysanthemi*) 之測試

Pectobacterium chrysanthemi 所造成的細菌性軟腐病害，對於蔬果作物是相當嚴重的病害，同時也會感染十字花科的阿拉伯芥，被感染的作物首先會於感染之所處形成水浸狀表型，爾後發病迅速並且將植物的細胞壁之果膠物質分解，因而呈現軟化腐爛的現象。

本研究採用 4 週大的阿拉伯芥植株進行實驗，接種條件為 $OD_{600}=0.001$ 的菌

液濃度，溶於 0.9% 的 NaCl 溶液中，接種方式，將每棵植株的 8 片 rosette leave 葉片，分別滴上 10 μ L 軟腐病菌菌液，觀察的時間點為 24、48 及 72 個小時，針對葉片感染程度記錄病徵發展級數，病徵級數依據 Higashi (2008) 進行分級，Level 0：無明顯病徵發生；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及腐爛情況。

14.7 菸草轉殖株之葉片 (detach leaf) 接種青枯病菌測試

菸草轉殖株接菌方面，本研究將 R1 世代的空載體轉殖株以及過量表現之 *SIERF Bla-1* 與 *SIERF Bla-3* 基因的菸草 R1 世代轉殖株，先於 1/2 MS 含有 8 ppm hygromycin 的抗生素固體培養基篩選兩週後，再移出並種植於 3 英寸土盆，馴化適應兩週後，及為四週大的菸草轉殖株，模擬青枯病菌感染後是否會於葉部組織進行增生，所接種的 *Rs* 菌系為 Pss4，接種菌量為 $OD_{600}=0.03$ 的菌液濃度，接種方式為利用針筒注射方式，注滿於菸草的整片葉片，分別在 0、18、24 及 48 個小時收取葉片進行菌量檢測，檢測方式為先將葉片測量重量後，分別加入 1 mL 之 ddH₂O 無菌水以研杵搗碎，吸取 100 μ L 組織萃取液以無菌水作以連續十倍序列稀釋方式，從各個序列稀釋的樣本中吸取 10 μ L 樣本點，點至培養於適合青枯病菌生長的半篩選培養基 SM1 培養基 (Lin et al., 2008)，並將培養基培養於溫度 28°C 生長箱，兩天後記錄青枯病菌之菌落 (colony) 生長情況，培養基成分列出於附錄 (附錄二十一)。

青枯病菌量的濃度是利用 SAS Proc Mixed (SAS Institute) 作統計分析。比較空載體 (pCAMBIA1300) 感染的對照組與過量表現之 *SIERF Bla-1* 與 *SIERF Bla-3* 基因的菸草 R1 世代轉殖株，其菌量增生的情況，以 Student's *t*-test 統計確認是否有顯著差異。

第三章 結果

1. 利用生物資訊分析番茄 *SIERF B1-a* 基因群親緣關係及啟動子元素

為了解番茄 *SIERF B1-a* 基因群與阿拉伯芥同源基因的相似程度，因此進行多基因比對與親緣關係分析，結果顯示番茄與阿拉伯芥 *SIERF B1-a* 基因群，都含有一個具 58 個胺基酸所組成之高保留性的 AP2/ERF domain，而在胺基酸的 C 端區域則具有保守序列 $^L/FDLN^L/F(X)P$ 為一典型 EAR motif (ERF-associated amphiphilic repression motif)，以及利用 ELM (Eukaryotic Linear Motif) 網站 (<http://elm.eu.org/help.html>)，預測到在 AP2/ERF domain 的 N 端中找到非典型 bipartite NLS (nuclear localization signal) 序列 (Dlngwall and Laskey, 1991) (圖一，A)，經由演化親緣關係的分析結果顯示，雖然屬於 *ERF B1a* 基因群，但屬同一物種其基因相似度還是較為高，由此推測其功能可能相近 (圖一，B)。

為了解此 *ERF B1-a* 基因群可能之表現與調控特性，因此藉由生物資訊的方式進行基因上游 3000 bp 啟動子區域之序列分析，結果顯示這些基因成員之可能啟動子區域帶有已知可被生物及非生物逆境、生長發育以及植物荷爾蒙調控的順式作用元素 (*cis-acting elements*)，因此，說明這五個基因成員之表現可能受到不同逆境因子調控 (表一)。

2. *SIERF B1a* 基因群蛋白在植物細胞的表現位置

為了瞭解 *SIERF B1a* 蛋白在細胞內的坐落位置，藉由 GFP 螢光蛋白融合 *SIERF B1a* 蛋白在阿拉伯芥原生質體短暫表現，觀察蛋白所表現之位置。實驗結果顯示，單獨表現 GFP 在 N 端或 C 端的空載體，螢光表現均勻於原生質體中，利用 CaMV 35S (Cauliflower mosaic virus 35S) 啟動子過量表現 *SIERF B1a* 蛋白與 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 所染色的部位有重疊表現，說明 *SIERF B1a* 蛋白綠色螢光集中表現的位置確實位於細胞內的細胞核，但是 GFP 融合五個 *SIERF B1a* 基因群的 N 端或 C 端會影響其蛋白進核比例，如圖二所示結果為約八成以上表現於細胞核中 (圖二)；反之，各約五成同時表現在細胞核及細胞質中。

3. *SIERF B1a* 基因群轉錄活性之分析 (transactivation assay)

為了解 *SIERF B1a* 轉錄因子是否確定具有轉錄活性抑制能力，因此利用阿拉

伯的原生質體，進行 *in vivo* 之轉錄活化分析。本實驗方法參考 Ohme-Takagi 等學者 (2008) 之系統，利用以酵母菌 *GAL4* 基因系統為主的兩種表現載體進行構築 (圖三, A)。自 herpes simplex virus 選殖到 viral protein 16 (VP16) 具強烈活化轉錄作用，NtERF3 第 191 至 225 胺基酸區域 (ERF3RD) 為已知具抑制轉錄活性 (Ohta et al., 2001)。研究結果 VP16 確實具有活化轉錄的活性，ERF3RD 確實具有抑制轉錄的活性，而 SIERF B1a 轉錄因子群與 VP16 轉錄活化子一起表現後，能降低 VP16 之轉錄活化能力 (圖三, B 與附錄三)，證實 SIERF B1a 轉錄因子群擁有 repressor 的功能。

4. SIERF B1-a 基因群在抗病品系番茄各組織之表現

為瞭解 SIERF B1-a 基因群在植物生長與發育之可能功能，故檢測在番茄不同生長期的各個組織中，這些基因之表現情形。結果 (圖四) 顯示 SIERF B1a-1 在花苞的表現量最高，其次為成熟的紅果；SIERF B1a-2 在成熟的紅果表現量最高為，其次是子葉；SIERF B1a-3 在真葉的表現量最高，其次是子葉與花苞；SIERF B1a-4 在真葉的表現量最高，其次為成熟的紅果；SIERF B1a-5 在真葉的表現量最高，其次為子葉與花苞。實驗結果顯示 SIERF B1-a 基因群在番茄不同生長階段與組織中各有其表現獨特性。

5. 植物荷爾蒙處理番茄後 SIERF B1-a 基因群之表現

為了解 SIERF B1-a 基因群使否受植物相關防禦荷爾蒙的調控影響，故檢測在番茄施與茉莉酸、水楊酸、離層酸、乙烯氣體，這些基因之表現情形。

本研究的結果顯示已知標誌基因 *WIP1-2* (van Schie et al., 2007) 的確被茉莉酸誘導表現，SIERF B1a-1 於第 1 個小時有最高誘導表現量，其後隨著時間增加其表現量呈下降趨勢 (圖五, A)；SIERF B1a-2 表現的趨勢隨著時間表現下降，於第 24 個小時又被誘導表現 (圖五, B)；而 SIERF B1a-3、SIERF B1a-4 與 SIERF B1a-5 基因表現則明顯被茉莉酸抑制 (圖五, C、D、E)。實驗結果顯示 SIERF B1-a 基因群對於茉莉酸的反應皆不同程度的表現。

本研究之結果顯示已知標誌基因 *Pti4* (Gu et al., 2002) 的確被水楊酸誘導表現，SIERF B1a-1 隨著時間至第 24 個小時有被誘導上升趨勢 (圖五, A)；SIERF

B1a-2、*SIERF B1a-3*、*SIERF B1a-4* 與 *SIERF B1a-5* 基因表現則明顯被水楊酸抑制 (圖五, B、C、D、E)。

本研究之結果顯示已知標誌基因 *TSRF1* (Zhang et al., 2008) 的確被離層酸誘導表現, *SIERF B1a-1* 隨著時間至第 24 個小時有被誘導上升趨勢 (圖五, A); *SIERF B1a-2* 於第 4 與 24 個小時有最高的表現趨勢 (圖五, B); *SIERF B1a-3* 其表現量明顯被離層酸抑制 (圖五, C); *SIERF B1a-4* 與 *SIERF B1a-5* 在第 4 個小時有最高的表現量, 隨後則逐漸下降 (圖五, D、E)。

本研究之結果顯示已知標誌基因 *Pti4* (Gu et al., 2002) 的確被乙烯誘導表現, *SIERF B1a-1* 於第 1 小時有最高的誘導表現量, 隨後則逐漸下降 (圖五, A); *SIERF B1a-2* 於第 2 小時有最高的誘導表現量, 隨後則逐漸下降 (圖五, B); *SIERF B1a-3* 明顯被乙烯抑制 (圖五, C); *SIERF B1a-4* 於第 2 個小時有最高表現量, 隨後則逐漸下降 (圖五, D); *SIERF B1a-5* 於第 1 個小時有最高的誘導表現量, 隨後則逐漸下降 (圖五, E)。以上結果說明, *SIERF B1-a* 基因群使受植物相關防禦荷爾蒙的不同程度的調控影響。

6. 番茄青枯病抗病與感病品系接種病菌後 *SIERF B1-a* 基因群之表現

為了解 *SIERF B1-a* 基因群表現是否受到青枯病菌感染而被調控, 將番茄抗病品系與感病品系同步以接種青枯病菌, 進行基因表現分析。同時比較抗病與感病基因表現結果, *SIERF B1a-1* 於抗病品系中第 4 個小時誘導表現最高, 隨後表現下降; 於感病品系中第 8 個小時誘導表現最高, 隨後表現下降 (圖六, A); *SIERF B1a-2* 於抗病品系中隨著時間其表現趨勢上升; 感病品系中則不被誘導 (圖六, B); *SIERF B1a-3* 於抗病品系中不被誘導; 感病品系中則呈下降趨勢 (圖六, C); *SIERF B1a-4* 於抗病品系中第 2 個小時誘導表現最高; 感病品系中則呈下降趨勢 (圖六, D); *SIERF B1a-5* 於抗病品系中接菌後第 8 個小時誘導表現最高; 感病品系中則呈下降趨勢 (圖六, E)。以上結果說明, *SIERF B1-a* 基因群無論在感病與抗病品系受到青枯病菌的誘導表現程度, 以及誘導表現之時間點均有不同反應。

7. 缺水逆境處理番茄後 *SIERF B1-a* 基因群之表現

為了解 *SIERF B1a* 基因群表現是否會受到乾旱逆境的調控, 實驗結果顯示已

知標誌基因 *Dec17* (*Dehydration C17*) (Weiss and Egea-Cortines, 2009) 之表現確實是被乾旱誘導 (圖七, A), *SIERF B1a-1* 基因的表現趨勢 (圖七, B) 與 *Dec17* 基因的趨勢相反, 說明此基因是被乾旱逆境所抑制表現, 然而於 *SIERF B1a-3* 與 *SIERF B1a-4* 此兩者的基因表現趨勢與 *Dec17* 基因的表現趨勢一致 (圖七, D、E), 說明此兩者的基因是被乾旱逆境所誘導表現, 其他兩位基因成員 *SIERF B1a-2* 與 *SIERF B1a-5* 在轉錄層次上則似乎未受乾旱逆境調控 (圖七, C、F)。

8. 番茄之 *SIERF B1a* 基因群經 VIGS 後對青枯病之反應

為了瞭解短暫基因靜默 *SIERF B1a* 基因群後, 其 RNA 的表現量下降程度, 首先, 設計專一片段進行 VIGS (表二), 接著再利用半定量 RT-PCR 方式, 檢測 *SIERF B1a* 基因與空載體的表現量, 顯示在不同的 PCR 擴增循環數皆有抑制情形 (圖八), 說明在番茄中成功靜默目標基因 *SIERF B1a* 基因群成員, 使其表現量下降。

初步了解在抗青枯病品系中, 將 *SIERF B1a* 基因群之五個基因各別短暫靜默掉後, 是否會影響抗病番茄品系對於青枯病的防禦能力, 於是本實驗利用 VIGS 方法進行抗病實驗, 並觀察其萎凋程度與數目, 實驗結果發現 TRV::*SIERF B1a-1* 總共觀察到 7 株有萎凋的外表型, TRV::*SIERF B1a-2* 總共觀察到 6 株有萎凋的外表型, TRV::*SIERF B1a-3* 只觀察到 1 株有萎凋的外表型, TRV::*SIERF B1a-4* 只觀察到 2 株有萎凋的外表型, TRV::*SIERF B1a-5* 總共觀察到 7 株有萎凋的外表型 (圖九)。此外, 偵測植物體內的菌量增生情況, 所得結果顯示 TRV::*SIERF B1a-1*、TRV::*SIERF B1a-2*、TRV::*SIERF B1a-4* 與 TRV::*SIERF B1a-5* 靜默植株在莖基部 (Stembase) 與莖部 (Mid-stem) 比對照組植物中之菌量高, 而在 TRV::*SIERF B1a-3* 靜默植株則無顯著差異 (表三)。顯示 *SIERF B1a-1*、*SIERF B1a-2*、*SIERF B1a-4* 與 *SIERF B1a-5* 基因似乎參與抗青枯病的調控, 而 *SIERF B1a-3* 卻在抗病品系中不參與青枯病的調控

由於在 VIGS 實驗中發現 *SIERF B1a-3* 基因在抗青枯病品系中對於青枯病的防禦能力無顯著改變, 故進一步分析 *SIERF B1a-3* 基因在感病品系病害反應之角色。首先, 確認短暫靜默 *SIERF B1a-3* 基因後, 其 RNA 轉錄產物的表現量下降 (圖十, A)。觀察接菌後的病程發展, 發現在接菌後的第十天, TRV::*SIERF B1a-3*

植物之萎凋比例較少 (圖十, B), 且於接菌後第五、六與七天的萎凋級數有顯著差異 (圖十, C)。因此, 在番茄感病品系中靜默 *SIERF Bla-3* 基因後可造成延遲萎凋病程的發展。

9. 番茄之 *SIERF Bla* 基因群經 VIGS 後對缺水逆境之反應

因為青枯病所造成的植物萎凋現象與水份輸送受阻的關聯性極大, 故希望進一步了解 *SIERF Bla* 基因群在乾旱逆境之可能功能。實驗的結果, 首先確認短暫靜默 *SIERF Bla* 基因群後, 其 RNA 轉錄產物的表現量下降 (圖十一, A), 接著進行完全不澆水的處理, 比較乾旱期間植株之乾枯變化情況, 可發現於乾旱第八、九與十天時, 對照組的萎凋比例與程度都較 TRV::*SIERF Bla* 為嚴重 (圖十一, C), 結果發現乾旱至第十天時, 空載體對照組植物的萎凋情況比 *SIERF Bla* 基因靜默的植物嚴重 (圖十一, B)。因此, 將 *SIERF Bla* 基因群短暫靜默掉後, 可提高番茄對於乾旱的耐受性。

10. 過量表現 *SIERF Bla-1* 與 *SIERF Bla-3* 之轉基因菸草對非生物逆境之反應

本研究首先由抗生素 hygromycin 篩選過量表現 *SIERF Bla-1* 與 *SIERF Bla-3* 之轉基因菸草, 再利用 genomic PCR 確認之 R1 世代轉植株, 並進一步檢測 35S::*SIERF Bla-1* 菸草轉植株中 *SIERF Bla-1* 基因表現高於空載體 2.3 倍至 3.6 倍 (圖十二, A), 35S::*SIERF Bla-3* 菸草轉植株中 *SIERF Bla-3* 基因表現高於空載體 2 倍至 4.7 倍 (圖十二, B), 證實基因表現量的確比空載體高, 計算 R1 世代的分離率顯示 35S::*SIERF Bla-1* 菸草轉植株介於 67% 至 77%, 推測可能為一個拷貝數 (copy number), 35S::*SIERF Bla-3* 菸草轉植株 R1 世代的分離率介於 69% 至 79%, 推測可能為一個拷貝數 (圖十二, C)。

為了瞭解 35S::*SIERF Bla-1* 與 35S::*SIERF Bla-3* 菸草轉植株其幼苗階段的生長發育, 是否會受 NaCl 鹽害、PEG 及離層酸逆境之影響。實驗結果顯示, 35S::*SIERF Bla-1* (圖十三) 與 35S::*SIERF Bla-3* (圖十四) 菸草轉植株, 於 NaCl 鹽害、PEG 及離層酸逆境生長 14 與 21 天, 無論是根部延長之長度或者相對根延長百分比與空載體皆無顯著差異。因此, 在 35S::*SIERF Bla-1* 與 35S::*SIERF Bla-3* 轉植菸草之幼苗階段, 對於非生物逆境的耐受性影響不大。

為了瞭解 35S::*SIERF Bla-1* 與 35S::*SIERF Bla-3* 菸草轉植株，在不同的生長階段是否會影響其對於 NaCl 鹽害及氧化逆境的容忍適應性，因此，本研究利用圓盤葉片的形式進行實驗。實驗結果顯示 35S::*SIERF Bla-1* 轉殖菸草有耐鹽的表現，葉片白化的數目與程度都比對照組少，於鹽分逆境下量化其葉綠素的總含量都比空載體的含量高，氧化逆境方面，實驗結果顯示轉殖菸草之白化程度與空載體植株無顯著差異 (圖十五，A、B)；35S::*SIERF Bla-3* 轉殖菸草有耐鹽的表現，葉片白化的數目與程度都比對照組少，於鹽分逆境下量化其葉綠素的總含量都比空載體的含量高，氧化逆境方面，實驗結果顯示轉殖菸草之白化程度與空載體植株無顯著差異 (圖十六，A、B)。

其次本研究更進一步利用四週大的成株，進行乾旱缺水逆境的測試，逐日觀察停止給水後其外表型的乾萎變化，並以萎凋級數登記進行量化。研究結果顯示，35S::*SIERF Bla-1* 菸草成株在乾旱逆境下 20 天的過程，與空載體比較後雖似乎有延緩乾萎的現象，但在統計上無顯著的差異 (圖十七，A)，並且計算乾旱後總共 20 天之相對乾旱曲線下面積亦無差異 (圖十七，B)。35S::*SIERF Bla-3* 菸草成株的研究結果顯示，在乾旱逆境下 20 天的過程，與空載體比較後雖似乎有較不抗旱的現象，但在統計上無顯著的差異 (圖十八，A)，計算乾旱後總共 20 天之相對乾旱曲線下面積，生物統計上皆無顯著差異 (圖十八，B)。

11. 過量表現 *SIERF Bla-1* 與 *SIERF Bla-3* 之轉基因菸草對病害逆境之反應

為了解 35S::*SIERF Bla-1* 與 35S::*SIERF Bla-3* 菸草轉植株中對青枯病的抵抗能力，本研究利用感染青枯病菌的轉植株菸草葉片進行菌量檢測。實驗結果顯示，35S::*SIERF Bla-1* 轉植株中青枯菌增生情況比較空載體雖似乎有稍微延緩情況，但統計上並無顯著差異 (圖十九，A)，其次利用 35S::*SIERF Bla-1* 四週大的菸草轉殖成株，模擬青枯病菌在田間對於植物的感染途徑，進行根部接種青枯病菌的測試，是否會影響其對於青枯病的抵抗力。研究結果顯示，35S::*SIERF Bla-1* 比起空載體萎凋的病程發展雖似乎大致稍微延緩，但統計上並無顯著差異 (圖十九，B)，並計算相對發病曲線下面積在統計上皆無顯著差異 (圖十九，C)。另外，35S::*SIERF Bla-3* 轉植株中青枯菌增生情況比較空載體雖似乎有稍微增加情況，但統計上並無顯著差異 (圖二十，A)，35S::*SIERF Bla-3* 比起空載體的病程發展趨勢

大致加速發病，但統計上無顯著差異（圖二十，B），並計算相對發病曲線下面積皆無顯著差異（圖二十，C）。

12. 過量表現 *SIERF B1a-1* 與 *SIERF B1a-3* 之轉基因菸草中檢測標誌基因表現

為了解在正常生長情況之下，*35S::SIERF B1a-1* 與 *35S::SIERF B1a-3* 菸草轉植株中是否會影響植物體內乙烯合成量，故本研究檢測 *35S::SIERF B1a-1* 轉植株中 ACC 合成酶基因與 ACC 氧化酶基因，實驗結果顯示 *SIERF B1a-1* 基因相對於空載體植株表現量都是下降的（圖二十一，A、B），此外，檢測乾旱相關基因 *NtEDR10A* (*early responsive to dehydration 10A*) 與 *NtEDR10C* 皆無受到顯著的調控（圖二十一，C、D），檢測病原菌誘導相關標誌基因的表現，顯示 *PR4* (*pathogenesis-related 4*) 基因雖有被誘導表現但表現量不高，但水楊酸訊息傳導途徑的 *PR1* (*pathogenesis-related 1*)、*PR2* (*pathogenesis-related 2*) 與 *SAR8.2* (*systemic acquired resistance 8.2*) 基因則無顯著表現，推測可能參與在茉莉酸/乙烯訊息傳導途徑中（圖二十一，E、F、G、H）。

其次本研究檢測 *35S::SIERF B1a-3* 轉植株中 ACC 合成酶基因與 ACC 氧化酶基因，實驗結果 *SIERF B1a-3* 基因相對於空載體植株表現量都是下降的（圖二十二，A、B），此外，檢測乾旱相關基因 *NtEDR10A* 與 *NtEDR10C* 皆無受到顯著的調控（圖二十二，C、D），檢測病原菌誘導相關標誌基因的表現，顯示 *PR4* 基因雖有被誘導表現但表現量不高，但水楊酸訊息傳導途徑的 *PR1*、*PR2* 與 *SAR8.2* 基因則無顯著表現，推測可能參與在茉莉酸/乙烯訊息傳導途徑中（圖二十二，E、F、G、H）。

13. 利用生物資訊分析 *SIERF B1a* 基因群在阿拉伯芥中之同源基因特性

為了瞭解番茄 *SIERF B1a* 基因群在阿拉伯芥之同源基因（表四），是否在生物及非生物逆境下亦扮演著重要角色，故搜尋阿拉伯芥資料庫，發現這些同源基因於種子與花粉中的表現量最高（附錄七），此外，除了會受乾旱處理而誘導表現外，對於生物及非生物逆境、植物荷爾蒙及不同突變體之下的反應皆不同，推測這些同源基因可能參與在生殖生長過程與乾旱逆境中（表五）。

14. 阿拉伯芥 *At5g44210* 同源基因剔除株對非生物逆境下之反應

因此欲了解在阿拉伯芥的同源基因 *At5g44210*，對於生物及非生物逆境中的功能角色，本研究自 ABRC 機構 (Arabidopsis biological resource center) 購買 T-DNA 插入 *At5g44210* 基因之三個 allelic mutants (圖二十三，A)。首先，依據 *At5g44210* 基因，所設計包含 5'UTR 區域與編碼區域 (CDS) 的引子，分別為 F_{UTR} 、 F_{CDS} 與 R_{CDS} ，以及 ABRC 所提供的 T-DNA border 引子 (圖二十三，A)，進行 genomic PCR 確認 T-DNA 確實有嵌入 *At5g44210* 基因，接著利用 F_{CDS} 與 R_{CDS} 引子對進行半定量 RT-PCR 檢測 RNA 表現量，結果確認這些插入基因不同位置的突變體皆為完全缺失突變體 (null mutants) (圖二十三，B)。

為了解 *At5g44210* 基因剔除突變體於各式非生物逆境下其種子的萌發反應，本研究進行種子發芽實驗，實驗結果發現，於正常 1/2 MS 的生長情況下 null mutants 與 Col-0 生長情況皆正常，在第七天幾乎種子皆發芽，但於 NaCl 100 mM、7% PEG、0.2 M Mannitol、4% glucose、0.3 μ M ABA 的環境中發芽皆比 Col-0 差 (圖二十四)，說明這些突變體對於本研究所模擬的非生物逆境之反應皆較為敏感。其次本研究進一步利用四周大 allelic mutants 進行完全不澆水的處理，實驗結果顯示，在處理後第 21 天與 30 天的生長情況，以及乾旱後 30 天進行回水處理，發現突變體與 Col-0 比較起來皆無顯著的差異 (圖二十五，A、B、C)，因此在本研究乾旱條件下突變體對乾旱耐受性無顯著差異。

15. 阿拉伯芥 *At5g44210* 同源基因剔除株對病害逆境之反應

為了了解茄科與十字花科的同源基因 *At5g44210* 基因是否參與對青枯病的抵抗能力。因此，本研究利用 *At5g44210* 基因完全缺失突變體進行青枯病菌的根部接種測試。實驗結果顯示，於接菌後第 6 天開始出現萎凋病徵，逐日觀察的結果發現 allelic mutants 與對照組 Col-0 之病程發展並無顯著差異 (圖二十六，A)，因此，在接種青枯病菌的測試中，對於青枯病的抵抗能力並無顯著性的差異。除上述病害之外，本研究亦用常見軟腐病害進行測試並觀察病徵發展，實驗結果顯示，三個突變體與對照組比較後發現，無論在哪個時間點皆無明顯的感病或抗病的現象 (圖二十六，B)。

第四章 討論

1. *SIERF B1a* (group VIIIa) 蛋白表現於細胞核內且具抑制轉錄能力

本研究顯示 *SIERF B1-a* 蛋白表現在植物細胞核內。然而，GFP 融合在 *SIERF B1a* 蛋白的 N 端或 C 端會影響其表現在細胞核的比例 (圖二)，其他 ERF 的文獻並未報導 GFP 融合在其 N 端或 C 端會影響蛋白表現位置 (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2010; Seo et al., 2010)，雖目前只預測到 *SIERF B1-a* 蛋白在 AP2/ERF domain 的 N 端中有非典型 bipartite NLS 序列 (圖一)，但可能在 *SIERF B1a* 中有影響蛋白入細胞核之其他重要訊號勝肽，未來可利用序列刪除策略找出可能的重要區域。

藉由序列比對 (圖一，A) 與轉錄活性分析的實驗 (圖三，B 與附錄三)，驗證 *SIERF B1a* subfamily 確實扮演抑制子類型 (repressor-type) 的轉錄因子，此結果與其他在阿拉伯芥、菸草及番茄中同樣擁有 EAR motif 的蛋白質之結果一致 (Fujimoto et al., 2000; Song et al., 2005; McGrath et al., 2005; Pan et al., 2010)。本研究雖已知 *SIERF B1a* 轉錄因子具轉錄抑制的活性，但仍須經由 EMSA (electrophoretic mobility shift assays) 實驗驗證這些轉錄因子是否真能與 GCC-box 等逆境誘導相關序列進行結合 (Tournier et al., 2003)。此外，目前已知 EAR motif 的作用機制有三種：第一是轉錄抑制子本身可負調控下游基因表現；第二，若轉錄抑制子被 ubiquitination 作用，即可使原本受抑制之基因活化；第三種則是與其他 co-repressor 進行交互作用，進而造成轉錄活性被抑制 (Koyama et al., 2003; Kazan, 2006; Szemenyei et al., 2008; Pauwels et al., 2010)。因此，未來可以針對 *SIERF B1a* 轉錄因子群如何抑制轉錄活性的機制深入探討，利用 protein-protein 交互作用的實驗設計，找出可能之共同抑制子與 ubiquitination 相關酵素蛋白，以及是否利用組蛋白乙醯化的機制造成轉錄的活性降低。

由於五個番茄 *SIERF B1a* 基因成員各有獨特性 (附錄二)，推測可能各具特別生理功能，故本研究進一步探討它們在病害及非生物逆境的角色扮演。

2. 番茄 *SIERF B1a-1* 基因正調控青枯病與鹽害抗性但負調控乾旱耐受性

本研究顯示 *SIERF B1a-1* 基因在番茄體內主要表現在花及果實中 (圖四)，推測此基因可能在番茄開花或果實發育時期具某些功能，但尚須進一步驗證。另一

方面，本研究顯示短暫靜默 *SIERF B1a-1* 基因之番茄植株其抗青枯病能力降低 (圖九與表三)，且 *SIERF B1a-1* 基因在番茄抗/感病品系接種青枯病菌後之表現皆被誘導 (圖六，A)，但該基因在抗病品系誘導表現量比感病品系較高且早，且 *SIERF B1a-1* 基因在活菌處理下表現量明顯較青枯病相關的 PAMPs 高 (附錄四)，由此推論 *SIERF B1a-1* 基因可能同時參與植物對抗病原菌的第一道防禦反應 (PAMPs-triggered immunity, PTI)，以及植物對抗病原菌經由分泌系統將毒力蛋白 (Effector) 藉以類似針筒狀之構造，直接送入宿主体內所激發起之第二級防禦反應 (Effector-triggered immunity, ETI)，且扮演正面的角色，然而，過量表現 *SIERF B1a-1* 基因則不影響對青枯病之耐病性 (圖十九)，該結果與 VIGS 結論並不一致，目前推測原因有兩點：一是，目前所獲得的過量表現 *SIERF B1a-1* 基因之轉殖株，其 *SIERF B1a-1* 基因的表現量不高，只有 2 至 4 倍 (圖十二，A、C)，且 *SIERF B1a-1* 基因轉殖中之培植體致死率極高，最後所獲之轉殖株其根部生長勢亦較弱 (圖十三)，故推測該基因不能表現過高，進而導致對逆境反應並不明顯。過去文獻指出，過量表現含有 EAR motif 的 ERF 蛋白，會使植物生長受到抑制 (Tsutsui et al., 2009; Seo et al., 2010; Pan et al., 2010)，因此未來必須進一步建立刪除 EAR motif 區域的 *SIERF B1a-1* 基轉菸草，且亦需進一步培育 RNAi 基轉番茄，以其更精準地觀察逆境反應情況；二是，亦有文獻指出 *ABO3* (*ABA overly sensitive 3*) 基因過量表現的轉殖株對於 ABA 處理不會有明顯的外表型，須靠其他相關蛋白協助其表現功能 (Ren et al., 2010)，因此 *35S::SIERF B1a-1* 之基轉菸草對於逆境反應不明顯，可能在植物體內只有表現該蛋白的部分功能，必須藉其他乙烯相關蛋白的共同協助或藉乙烯誘發的相關轉譯後修飾作用 (ET-triggered post-translational modification)，才會使 *SIERF B1a-1* 蛋白有完整的功能表現。此外，在防禦訊息機制之探討上，本研究顯示 *SIERF B1a-1* 基因會受到 ET、SA 與 JA 等相關防禦荷爾蒙所誘導表現 (圖五，A)，且 *SIERF B1a-1* 基因也參與 ET、SA 與 JA 訊息傳遞途徑並扮演正面調節的角色 (附錄五)，其次，過量表現 *SIERF B1a-1* 的基轉菸草於正常生長條件下其內生性 *PR4* 基因表現增加 (圖二十一，H)，證實 *SIERF B1a-1* 基因的確參與在 JA/ET 途徑，可能扮演正面調節角色，且深入探討發現，其內生性的乙烯合成相關基因皆下降 (圖二十一，A、B)，推測可能原因如下，*SIERF B1a-1* 基因過量表現可使植物的乙烯合成相關基因表現下降 (Zuo et al., 2007)，或

許使植物延緩老化，對於植物抵抗逆境有正向協助，過去文獻指出 *ERF* 基因過量表現會回饋導致乙烯大量生合成，進而造成抗病能力降低 (Pirrello et al., 2006)，因此未來必須檢測內生性乙烯的含量，以期更精準地驗證此推論。故綜合目前結果可知，*SIERF Bla-1* 基因可能廣泛性地參與在 SA、JA 和 ET 防禦途徑，且參與番茄抗青枯病之防禦機制。

在乾旱研究中，本研究顯示 *SIERF Bla-1* 基因靜默可增加番茄之耐旱性 (圖十一)，且該基因之表現會受乾旱逆境抑制 (圖七，B)，故推測 *SIERF Bla-1* 基因在乾旱逆境中可能扮演負面角色；然而，過量表現 *SIERF Bla-1* 基因之菸草轉植株則不影響對乾旱之耐受性 (圖十七)，該結果與 VIGS 結論並不一致，推測原因與上述的推論相同，故不在此詳述。在非生物逆境中，本研究顯示過量表現 *SIERF Bla-1* 基因之菸草對鹽害的耐受性增加 (圖十五，A)，故目前初步推論 *SIERF Bla-1* 基因在鹽害逆境扮演正面角色，但未來需於不同植物生長時期反復驗證此推論，例如可以成株澆灌鹽害處理觀察其反應，亦可檢測菸草內生性相關防禦基因表現，藉以釐清 *SIERF Bla-1* 之調控機制 (Trujillo et al., 2008)。

3. 番茄 *SIERF Bla-3* 基因負調控青枯病與乾旱抗性但正調控鹽害耐受性

本研究顯示 *SIERF Bla-3* 基因在番茄體內主要表現在葉及花 (圖四)，推測此基因可能在番茄葉部生長與開花時期具某些功能，但尚須進一步驗證。另一方面，本研究顯示短暫靜默 *SIERF Bla-3* 基因之感病番茄植株有延遲萎凋現象 (圖十，B、C)，推斷其在病害防禦上具負面功能，上述推論亦可從轉錄層次得到支持，在感病品系隨著接種青枯病菌後，*SIERF Bla-3* 基因表現受抑制情形亦越明顯，但於抗病品系並無受到調控 (圖六，C)，且在抗病品系中，*SIERF Bla-3* 基因其表現皆受到 ET、SA、JA 與 ABA 所抑制 (圖五，C)，故可知 *SIERF Bla-3* 基因的確在抗/感病品系中之反應非常不同，且在病害防禦上扮演負面調控角色，但過量表現 *SIERF Bla-3* 基轉菸草則不影響對青枯病之感病性 (圖二十)，然而，該結果與 VIGS 結論並不一致，推測原因如上述第二部分之討論，故不在此詳述。另一方面，在防禦訊息機制之探討上，過量表現 *SIERF Bla-3* 的基轉菸草於正常生長條件下其內生性 *PR4* 基因表現增加 (圖二十二，H)，推測 *SIERF Bla-3* 基因可能參與在 JA/ET 途徑並且扮演負面調節病害之角色。此外，深入探討發現，過量表現

SIERF Bla-3 的基轉菸草其內生性乙烯合成相關基因皆下降 (圖二十二, A、B), 推測此基因在抗病性的角色扮演不具影響性, 可能只影響植物乙烯生合成的表現, 然而, 箇中調控機制尚須進一步驗證。

在非生物逆境中, 本研究顯示 *SIERF Bla-3* 基因靜默番茄植株可增加耐旱性 (圖十一), 顯示 *SIERF Bla-3* 基因的確參與在缺水之機制防禦中, 且可能扮演負面角色。而在轉錄層次上, 本研究發現 *SIERF Bla-3* 基因表現在 ABA 處理下受到抑制 (圖五, C), 顯示該基因可能是藉由 ABA dependent 途徑調控乾旱逆境反應。不過有趣的是, *SIERF Bla-3* 基因卻可被乾旱逆境所誘導 (圖七, D), 但截至目前結果因還未能完全解釋箇中關聯, 故仍待藉由更多實驗加以釐清。然而, 過量表現 *SIERF Bla-3* 基因則不影響植物對乾旱之耐受性 (圖十八與圖二十二), 該結果與 VIGS 結論並不一致, 推測原因如上述第二部分的討論, 故不在此詳述。另一方面, 本研究顯示過量表現 *SIERF Bla-3* 基因之菸草對鹽害的耐受性增加 (圖十六, A), 故目前初步推論 *SIERF Bla-3* 基因在鹽害逆境扮演正面角色, 但未來需於不同植物生長時期反復驗證此推論, 例如可以成株澆灌鹽害處理觀察其反應, 亦可檢測菸草內生性相關防禦基因表現, 藉以釐清 *SIERF Bla-3* 之調控機制。

4. 番茄 *SIERF Bla-2/4/5* 基因成員有不同的獨特性

本研究顯示, *SIERF Bla-2* 基因主要表現在番茄幼苗及果實的時期 (圖四), 推測此基因表現參與在幼苗與果實發育階段具某些功能, 但尚須進一步驗證。另一方面, 本研究顯示 *SIERF Bla-2* 基因靜默之抗病番茄會導致抗青枯病之能力下降 (圖九與表四), 而在番茄抗/感病品系接種青枯病菌後, 該基因之表現僅在抗病品系被誘導, 且誘導時間點較晚 (圖六, B), 且該基因亦可受到青枯病相關 PAMPs 所誘導 (附錄四), 故依據目前結果推測, *SIERF Bla-2* 基因不但受多種病原形式調控, 且可能在番茄抗青枯病防禦中扮演正面角色, 但未來仍必須藉由更多實驗加以驗證此推論。另一方面, *SIERF Bla-2* 基因在乙烯與茉莉酸處理下可受到誘導 (圖五, A), 故目前推測抗病品系中, *SIERF Bla-2* 基因可能是藉由乙烯與茉莉酸之調控機制, 進而影響植物抗病反應。在非生物逆境中, 短暫靜默 *SIERF Bla-2* 基因之番茄植株可增加乾旱耐受性 (圖十一); 在轉錄層次上, *SIERF Bla-2* 基因並不受乾旱影響 (圖七, B), 但可被 ABA 所誘導 (圖五, B), 因此, 依據目前結果

僅能推測此基因可能在乾旱逆境中扮演負調控角色，但其中分子機制仍待釐清。

本研究顯示，*SIERF Bla-4* 基因在番茄體內主要表現在葉、花及果實中 (圖四)，推測此基因參與在番茄營養生長與生殖生長階段具某些功能，但尚須進一步驗證。另一方面，本研究顯示 *SIERF Bla-4* 基因靜默之番茄植株對青枯病之抗性下降 (圖九與表四)，初步推論該基因在抗青枯病防禦上可能扮演正面角色，而該推論亦可從 *SIERF Bla-4* 基因在番茄抗/感病品系之調控得到支持。本研究發現，在番茄抗病品系接種青枯病菌後，*SIERF Bla-4* 基因於早期可受到強烈誘導，但於感病品系卻受到抑制 (圖六，D)，且該基因受活菌誘導表現量大於 PAMPs (指病原菌表面特定可供植物受器辨認之分子標誌) (附錄四)，亦受乙烯所誘導 (圖五，D)，故推測在抗病品系中 *SIERF Bla-4* 基因可能藉由乙烯、PTI 與 ETI 的途徑影響病害反應。此外，*SIERF Bla-4* 基因靜默之番茄植株可增加耐旱性 (圖十一)，然而，基因表現雖不受乾旱影響 (圖七，E)，卻可被 ABA 誘導 (圖五，D)，因此，依據目前結果僅能推測此基因可能在乾旱逆境中扮演負調控角色，但其中分子機制仍待釐清。

本研究顯示 *SIERF Bla-5* 基因在番茄體內主要表現在葉及花 (圖四)，推測此基因參與在番茄葉部生長與開花過程具某些功能，但尚須進一步驗證。另一方面，本研究顯示 *SIERF Bla-5* 基因靜默之抗病番茄植株對抗青枯病之抵抗能力下降 (圖九與表四)，本研究結果顯示，番茄抗/感病品系接種青枯病菌後，該基因之表現分別在抗病品系後期被誘導；於感病品系中則表現下降 (圖六，E)，而且在青枯菌 (活菌) 處理下，該基因誘導表現量明顯較 PAMPs 高 (附錄四)，亦受乙烯誘導 (圖五，E)，推測 *SIERF Bla-5* 基因在抗病品系中藉由乙烯、PTI 與 ETI 啟動防禦反應。另外，*SIERF Bla-5* 基因靜默之番茄植株可增加耐旱性 (圖十一)，該基因亦受到乾旱與 ABA 誘導 (圖七，E 與圖五，E)，因此，依據目前結果僅能推測由於其本身為轉錄抑制子，可能在轉譯層次上扮演負調控的角色 (Kazan, 2006; Zhang et al., 2010)，所以 *SIERF Bla-5* 基因靜默後的植株可能促進內生性抗旱基因表現，進而造成抗旱表現。

目前的研究結果顯示，*SIERF Bla-2/4/5* 基因可能參與在抗乾旱與抗青枯病的防禦機制中，未來可培育各別過量表現 *SIERF Bla-2/4/5* 基因或 RNAi 之番茄轉殖株，進一步確認對於病害或乾旱等逆境之反應及其中相關分子機制。

5. 阿拉伯芥同源基因 *At5g44210* 完全缺失突變株對非生物逆境的耐受性降低

由於 *At5g44210* 基因主要表現在種子 (附錄七)，且 *at5g44210* 完全缺失突變株在種子萌發階段對鹽害、模擬乾旱、滲透壓、糖分與 ABA 等逆境較為敏感 (圖二十四)，故推測該基因在非生物逆境中扮演正面的角色；同時，這些結果與前述 *SIERF Bla-1* 基因在鹽分反應具正面功能相符，顯示番茄 *SIERF Bla-1* 基因與其阿拉伯芥同源基因在鹽分逆境下都扮演正面角色。然而，阿拉伯芥突變株在乾旱逆境測試上，與野生株並無明顯差異 (圖二十五)，這與番茄 *SIERF Bla-1* 同源基因在乾旱逆境扮演負面角色並不相同，推測可能原因有二：一為，不同的生長階段可能會影響對乾旱因子的反應；二是，不同物種間之同源基因功能性不一定相等 (Zhang et al., 2004b)。未來應可在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分析的方向 (表五)，進行其他逆境處理，更加深入分析 *At5g44210* 基因在非生物逆境中所扮演的功能，此外，也可藉由檢測乾旱相關下游基因，探討抗乾旱逆境之分子機制。

此外，本研究發現，當阿拉伯芥 *At5g44210* 基因缺失後，對青枯病或者軟腐病之反應無顯著改變 (圖二十六, A、B)，顯示該基因在抗病防禦上與其番茄 *SIERF Bla-1* 同源基因所扮演的正面角色不相同，推測可能原因如下：首先，阿拉伯芥 ERF 為龐大的基因家族 (Nakano et al., 2006)，可能有基因冗餘性 (redundancy) 現象，因此單一基因突變缺失無法突顯在抗病上的角色功能；其次，接種方式可能不適合，由於目前採用方式係將植株嚴重斷根後再施以青枯病菌 (Lin et al., 2008)，推測每株斷根傷害程度不同，會造成植株對病害反應有差異性，故未來改採不斷根直接澆灌方式，期準確觀察病程發展；第三種可能原因為阿拉伯芥在抵抗不同病原菌的感染時，會啟動不同的荷爾蒙防禦途徑 (Berrocal-Lobo et al., 2002)，故推論 *At5g44210* 基因可能不參與本研究接種病菌所誘導的抗病途徑，所以未來也可參考微陣列資料庫所分析的方向 (表五)，進行其他病原菌處理，更加深入分析 *At5g44210* 基因在病害逆境中所扮演的功能，此外，也可藉由檢測 *at5g44210* 完全缺失突變株內其相關防禦基因之表現情形，釐清 *At5g44210* 基因所參與之病害防禦路徑。

6. 總結

本研究發現番茄 *SIERF Bla* (group VIIIa) 抑制轉錄因子群，在青枯病害與非生物逆境中，具有其獨特且多元性的功能。綜合 *SIERF Bla-1* 的過量表現與短暫靜默之結果，推斷此基因在青枯病害與鹽害扮演正面角色，但在乾旱逆境扮演負面角色；然而，*SIERF Bla-3* 則在鹽害扮演正面角色，但在青枯病害與乾旱逆境扮演負面角色。此外，這兩個基因也可能參與乙烯/茉莉酸相關防禦途徑的調節；另一方面，番茄 *SIERF Bla-1* 其同源基因 *At5g27870* 在鹽分逆境亦具正面功能，但在病害及乾旱反應並無影響，顯示 *SIERF Bla-1* 基因在不同物種間其功能或許不盡相同。未來期望透過更深入探討 *SIERF Bla* 基因群在病害與非生物逆境之功能，建立 *ERF Bla* 基因群的抗逆境防禦機制與網絡。



第五章 未來展望

針對 *SIERF B1a* 基因群的蛋白表現未來研究，未來可利用序列連續刪除找出可能影響蛋白正確入細胞核之重要訊號勝肽；其次，轉錄活性分析的實驗方面，未來可以針對 *SIERF B1a* 轉錄因子群如何抑制轉錄活性的機制深入探討，利用 protein-protein 交互作用的實驗設計，找出可能之共同抑制子與 ubiquitination 相關酵素蛋白，以及是否利用組蛋白乙酰化的機制造成轉錄的活性降低。最後，仍須經由 EMSA (electrophoretic mobility shift assays) 實驗驗證這些轉錄因子是否真能與 GCC-box 等逆境誘導相關序列進行結合 (Tournier et al., 2003)。

針對 *SIERF B1a* 基因群的基因表現未來研究：(1) 未來除了第三型分泌系統缺失的突變體 (TTSS defective *hrpG* mutant) 與青枯病細胞物質 (*Rs* lysate) 之外，可就不同病原菌的 PAMPs 包含細菌的 Flg22 (22 amino acids flagellin peptide)、革蘭氏陽性細菌的肽聚糖 (peptidoglycan, PGN)、細菌延伸因子 Tu (elongation factor Tu, EF-Tu) 與真菌的幾丁質 (chitin) 進行處理，探討基因表現；(2) 植物荷爾蒙防禦途徑的參與：未來可加入 ABA 或其他途徑進行討論。

針對 *SIERF B1a* 基因群之靜默植株探討可能調控機制，檢測病原相關防禦基因 *PR3* (chitinase)、*PR13* (thionin)、*GluB* (glucanase B) 等，或檢測相關被乾旱誘導的基因如 *Dec17* 等釐清可能調控的機制。

針對過量表現 *SIERF B1a-1* 或 *SIERF B1a-3* 之轉植株探討：(1) 檢測病原相關 *PR* 防禦基因或乾旱誘導基因釐清可能調控機制；(2) 增加處理植物樣本數或改變實驗處理方法進行乾旱與病害之逆境檢測；(3) 藉由不同特性的病原菌進行檢測，如 necrotrophic 或卵菌綱 (Oomycetes) 病害等；(4) 可將 R2 世代的種子進行 PAMPs 或其他非生物逆境的發芽率檢測；(5) 利用 RNAi 轉植株檢測對於病害或乾旱等逆境反應。另外，可進一步刪除 *SIERF B1a* 基因的 EAR motif 區域進行轉殖，同時也與 *SIERF B1a* 基因全長轉植株進行比較是否會影響抗病能力。

針對其他 *SIERF B1a-2/4/5* 基因利用短暫 VIGS 進行初步功能研究，最終還是必須要藉由 RNAi 轉植株進一步檢測對於病害或乾旱等逆境反應。未來可進一步刪除 *SIERF B1a-2/4/5* 基因的 EAR motif 區域進行轉殖，同時也與 *SIERF B1a-2/4/5* 基因全長轉植株進行比較是否會影響生長及抗病表現。

針對 *At5g44210* 完全缺失突變體之未來探討：(1) 以切離葉片處理 NaCl 鹽

分及氧化逆境，亦或是將此基因過量表現在阿拉伯芥中，進一步比較 *At5g44210* 基因過量表現與基因剔除對逆境的反應；(2) 分析啟動子序列；(3) 改變接菌方式，如改植物不斷根接種青枯病進；(4) 參考搜尋資料庫的結果，利用 hemi-biotrophic 的 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 或 necrotrophic 的 *Botrytis cinerea* 等不同病原菌進行感染測試；(5) 檢測 *At5g44210* 完全缺失突變體內其相關防禦基因之表現情形，釐清其參與之防禦路徑。



參考文獻

- Arnon, D.I.** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1-15.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R.** (2002). Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* **29**, 23–32.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Poschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D., and Lee, J.** (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8067-8072.
- Brown, R.L., Kazan, K., McGrath, K.C., Maclean, D.J., Manners, J.M.** (2003). A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**, 1020–1032.
- 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.
- 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.
- Chan, Y.L., Prasad, V., Sanjaya, Chen, K.H., Liu, P.C., Chan, M.T., and Cheng, C.P.** (2005). Transgenic tomato plants expressing an *Arabidopsis* thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. *Planta* **221**, 386-393.
- Chen, Y.Y., Lin, Y.M., Chao, T.C., Wang, J.F., Liu, A.C., Ho, F.I., and Cheng, C.P.** (2009). Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiol Plant* **136**, 324-335.
- 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., Khounlotham, 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.

Denny, T.P. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In plant-Associated Bacteria, S.S. Gnanamanickam, ed (Dordrecht, The Netherlands: Skpringer Publishing), pp. 573-644.

Dietz, K.J., Vogel, M.O., and Viehhauser, A. (2010). AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signaling. Protoplasma **245**, 1-13.

Dingwall, C., and Laskey, R.A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus ? Trends Biochem Sci. **16**, 478-81.

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.

Dong, N., Liu, X., Lu, Y., Du, L., Xu, H., Liu, H., Xin, Z., and Zhang, Z. (2010). Overexpression of *TaPIEPI*, a pathogen-induced ERF gene of wheat, confers host-enhanced resistance to fungal pathogen *Biopolaris sorokiniana*. Funct Integr Genomics **10**, 215-226.

Fernandez, O., Béthencourt, L., Quero, A., Sangwan, R.S., and Clément, C. (2010). Trehalose and plant stress responses: friend or foe? Trends in Plant Sci **15**, 409-417.

Fischer, U., and Droge-Laser, W. (2004). Overexpression of *NtERF5*, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus. Mol Plant Microbe Interact **17**, 1162-1171.

Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M. (2000). *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional

- activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393–404.
- Genin, S.** (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol* **187**, 920–928.
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., and McCourt, P.** (2000). Regulation of Abscisic Acid Signaling by the Ethylene Response Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1117–1126.
- Gill, S.S., and Tuteja, N.** (2010) Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Beh* **5**, 26-33.
- Godiard, L., Sauviac, L., Torii, K.U., Grenon, O., Mangin, B., Grimsley, N.H., and Marco, Y.** (2003). ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J* **36**, 353–365.
- Groppa, M.D., and Benavides, M.P.** (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**, 35-45.
- Gu, Y.Q., Wildermuth, M.C., Chakravarthy, S., Loh, Y.T., Yang, C., He, X., Han, Y., and Martin, G.B.** (2002) Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 817–831.
- Hase, S., Takahashi, S., Takenaka, S., Nakaho, K., Arie, T., Seo, S., Ohashi, Y., and Takahashi, H.** (2008). Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathol* **57**, 870-876.
- 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., Ichinose, Y.** (2008). Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **279**,

303–312.

- Hill, K., Wang, H., and Perry, S.E.** (2008). A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *Plant J* **53**, 172-85.
- Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* **61**, 1041-1052.
- Hiratsu, K., Ohta, M., Matsui, K., and Ohme-Takagi, M.** (2002). The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Lett* **514**, 351-354.
- 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.
- Huang, Z., Zhang, Z., Zhang, X., Zhang, H., Huang, D., and Huang, R.** (2004). Tomato TERF1 modulates ethylene response and enhances osmotic stress tolerance by activating expression of downstream genes. *FEBS Lett* **573**, 110–116.
- Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Montagu, M., Okamoto, J.K.** (1994). Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Cell* **6**, 1211-25.
- Jones, 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.R., Wing, R., Jeong, Y., Hwang, I., and Kim, M.** (2007). The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in Arabidopsis. *Planta* **225**, 575-588.
- Kagale, S., and Rozwadowski, K.** (2011). EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: An underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics* **6**, 141-146.
- Kazan, K.** (2006). Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. *Trends Plant Sci* **11**, 109-112.
- Kendrick, M.D., and Chang, C.** (2008). Ethylene signaling : new levels of complexity and regulation. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 479-485.

- 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 Biotech* **24**, 409-416.
- Koyama, T., Okada, T., Kitajima, S., Ohme-Takagi, M., Shinshi, H., and Sato, F.** (2003) Isolation of tobacco ubiquitin-conjugating enzyme cDNA in a yeast two-hybrid system with tobacco ERF3 as bait and its characterization of specific interaction. *J Exp Bot* **54**, 1175-1181.
- Kumagai, M.H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., and Grill, L.K.** (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl Acad Sci USA* **92**, 1679-1683.
- 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.
- Liang, H., Lu, Y., Liu, H., Wang, F., Xin, Z., and Zhang, Z.** (2008). A novel activator-type ERF of *Thinopyrum intermedium*, *TiERF1*, positively regulates defence responses. *J Exp Bot* **59**, 3111-3120.
- Licausi, F., Giorgi, F.M., Zenoni, S., Osti, F., Pezzotti M., and Perata, P.** (2010). Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics*. **11**, 719-731.
- Licausi, F., van Dongen, J.T., Giuntoli, B., Novi, G., Santaniello, A., Geigenberger, P., and Perata, P.** (2010). HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **62**, 302-315.
- 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, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P. (2002a). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* **31**, 777-786.

Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L., and Baulcombe, D.C. (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J* **22**, 5690-5699.

Lumba, S., Cutler, S., and McCourt, P. (2010). Plant nuclear hormone receptors: a role for small molecules in protein-protein interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 445-469.

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.

Mandal, S., Das, R.K., and Mishra, S. (2010). Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol Biochem* **48**, 811-818.

Marsch-Martinez, N., Greco, R., Becker, J.D., Dixit, S., Bergervoet, J.H., Karaba, A., de Folter, S., and Pereira, A. (2006). BOLITA, an Arabidopsis AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. *Plant Mol Biol* **62**, 825-843.

Mazarei, M., Elling, A.A., Maier, T.R., Puthoff, D.P., and Baum, T.J. (2007). *GmEREBP1* is a transcription factor activating defense genes in soybean and Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 107–119.

McGinnis, K.M. (2010). RNAi for functional genomics in plants. *Brief Funct Genomics* **9**, 111-7.

- McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.R., Udvardi, M.K., and Kazan, K.** (2005) Repressor and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiol* **139**, 949-959.
- Mittler, R., Kim, Y., Song, L., Coutu, J., Coutu, A., Ciftci-Yilmaz, S., Lee, H., Stevenson, B., Zhu, J.K.** (2006). Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Lett* **580**, 6537–6542.
- Morris, C.E., Bardin, M., Kinkel, L.L., Moury, B., Nicot, P.C. and Sands, D.C.** (2009). Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries. *PLoS Pathog* **5**, e1000693.
- 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.
- Murray, S.L., Ingle, R.A., Petersen, L.N., and Denby, K.J.** (2007). Basal resistance against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis involves WRKY53 and a protein with homology to a nematode resistance protein. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1431–1438.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., and Shinshi, H.** (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* **140**, 411-432.
- O'Donnell, P. J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J.B., and Klee, H.J.** (2003b). Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiol* **133**, 1181-1189.
- Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H.** (1995). Ethylene-inducible DNA-binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-182.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959-1968.
- Oksman-Caldentey, K.M.** (2007). Tropane and nicotine alkaloid biosynthesis: novel approaches towards biotechnological production of plant-derived pharmaceuticals.

Curr Pharm Biotechnol **8**, 203-210.

- Onate-Sanchez, L., Anderson, J.P., Young, J., and Singh, K.B.** (2007). *AtERF14*, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiol* **143**, 400-409.
- Pandey, G.K., Grant, J.J., Cheong, Y.H., Kim, B.G., Li L., and Luan, S.** (2005) ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**, 1185-1193.
- Pan, I.C., Li, C.W., Su, R.C., Cheng, C.P., Lin, C.S., and Chan, M.T.** (2010). Ectopic expression of an EAR motif deletion mutant of SIERF3 enhances tolerance to salt stress and *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Planta*. **232**, 1075-86.
- Park, J.M., Park, C.J., Lee, S.B., Ham, B.K., Shin, R., and Paek, K.H.,** (2001). Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-Type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* **13**, 1035-1046.
- 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.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., and Perez, A.C.** (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**, 788-791.
- Peele, C., Jordan, C.V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrout, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L., and Robertson, D.** (2001). Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J* **27**, 357-366.
- Pirrello, J., Jaimes-Miranda, F., Sanchez-Ballesta, M.T., Tournier, B., Khalil-Ahmad, Q., Regad, F., Latche, A., Pech, J.C., and Bouzayen, M.** (2006). Sl-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant Cell Physiol* **47**, 1195-1205.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C., Genin, S.** (2009). Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host range specificity on

tobacco. *Molecular Plant Microbe Interactions* **22**, 538-550.

- Poueymiro, M., Genin, S.** (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol* **12**, 44-52.
- Ren, X., Chen, Z., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, M., Liu, Q., Hong, X., Zhu, J.K. and Gong, Z.** (2010). ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *Plant J* **63**, 417-429.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O., and Baulcombe, D.C.** (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**, 937-946.
- Ruzicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorska, R., Beekman, T., Friml, J., Benkova, E.** (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* **19**, 2197-2212.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi, S.K.** (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 998-1009.
- Schaller, G.E., and Kieberb, J.J.** (2002). Ethylene. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., and Shinozaki, K.** (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin in Plant Biol* **10**, 296-302.
- Senthil-Kumar, M., Govind, G., Kang, L., Mysore, K.S., and Udayakumar, M.** (2007). Functional characterization of *Nicotiana benthamiana* homologs of peanut water deficit-induced genes by virus-induced gene silencing. *Planta*. **225**, 523-539.
- Senthil-Kumar, M., Gowd, H.V.R., Hema, R., Mysore, K.S., Udayakumar, M.** (2008). Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance. *Journal of Plant Physiol* **165**, 1404-1421.
- 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.
- Seo, Y.J., Park, J.B., Cho, Y.J., Jung, C., Seo, H.S., Park, S.K., Nahm, B.H., and Song J.T.**, (2010). Overexpression of the ethylene-responsive factor gene BrERF4 from *Brassica rapa* increases tolerance to salt and drought in *Arabidopsis* Plants Mol Cells **30**, 271-277.
- Sharma, M.K., Kumar, R., Solanke, A.U., Sharma, R., Tyagi, A.K., and Sharma, A.K.** (2010). Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Mol Gen Genet* **284**, 455-75.
- Sharoni, A.M., Nuruzzaman, M., Satoh, K., Shimizu, T., Kondoh, H., Sasaya, T., Choi, R., Omura, T., and Kikuchi, S.** (2010). Gene Structures, Classification, and Expression Models of the AP2/EREBP Transcription Factor Family in Rice. *Plant Cell Physiol* **51**, 19003-1913.
- Song, C.P., Agarwal, M., Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., and Wang, P.** (2005). Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **17**, 2384-96.
- Song, C.P., and Galbraith, D.W.** (2006). AtSAP18, an orthologue of human SAP18, is involved in the regulation of salt stress and mediates transcriptional repression in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **60**, 241-57.
- Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V., Alonso, J.M.** (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **19**, 2169-2185.
- Stepanova, A.N., and Alonso, J.M.** (2009). Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 548–555.
- Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J.A.** (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* **319**, 1384-1386.
- Tang, M., Sun, J., Liu, Y., Chen, F., and Shen, S.** (2007). Isolation and functional characterization of the *JcERF* gene, a putative AP2/EREBP domain-containing

- transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*. *Plant Mol Biol* **63**, 419–428.
- Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**, 533-543.
- Tournier, B., Sanchez-Ballest, M.T., Jones, B., Pesquet, E., Regad, F., Latche, A., Pech J.C., and Bouzayen, M.** (2003). New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Letters* **550**, 149-154.
- Trujillo, L.E., Sotolongo, M., Menendez, C., Ochogavia, M.E., Coll, Y., Hernandez, I., Borrás-Hidalgo, O., Thomma, B.P., Vera, P., and Hernandez, L.** (2008). SodERF3, a novel sugarcane ethylene responsive factor (ERF), enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tobacco plants. *Plant Cell Physiol* **49**, 512–525.
- Tsukagoshi, H., Morikami, A., and Nakamura, K.** (2007). Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2543-2547.
- Tsutsui, T., Kato, W., Asada, Y., Sako, K., Sato, T., Sonoda, Y., Kidokoro, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tamaoki, M., Arakawa, K., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Ikeda, A., and Yamaguchi, J.** (2009). DEAR1, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in *Arabidopsis*. *J Plant Res* **122**, 633–643
- Tuteja, N., and Sopory, S.K.** (2008). Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signal Beh* **3**, 525-36.
- Van Schie C.C.N., Haring M.A., Schuurink R.C.** (2007). Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Mol Biol* **64**, 251–263.
- Vasse J., Danoun S., Trigalet A.** (2005). Microscopic studies of root infection in resistant tomato cv. Hawaii7996. In: Allen C, Hayward AC (eds) *Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex*. APS Press St Paul MN pp 285–291.

- Wang, H., Huang, Z., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Wu, Y., Huang, D., Huang, R.** (2004). Ectopic overexpression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol Biol* **55**, 183–192.
- 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.
- Wang, Q., Guan, Y., Wu, Y., Chen, H., Chen, F., and Chu, C.** (2008b). Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. *Plant Mol Biol* **67**, 589–602.
- Weigel, R.R., Pfitzner, U.M., and Gatz, C.** (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 1279-1291.
- Weiss, J., and Egea-Cortines, M.** (2009). Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress. *Journal of Applied Genetics*. **50**, 311-319.
- Wu, L., Chen, X., Ren, H., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, J., Wang, X.C., and Huang, R.** (2007). ERF protein JERF1 that transcriptionally modulates the expression of abscisic acid biosynthesis-related gene enhances the tolerance under salinity and cold in tobacco. *Planta* **226**, 815–825.
- Wu, L., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, X.C., and Huang, R.** (2008). Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiol* **148**, 1953–1963.
- Xiong, Y., and Fei, S.Z.** (2006). Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Planta* **224**,

878–888.

- Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang-Rodriguez, R., Heuer, S., Ismail, A.M., Bailey-Serres, J., Ronald P.C., and Mackill, D.J.** (2006). Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**, 705-708.
- Yanagisawa, S., Yoo, S.D., and Sheen, J.** (2003). Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* **425**, 521-525.
- Zhang, G., Chen, M., Li, L., Xu, Z., Chen, X., Guo, J., and Ma, Y.** (2009). Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J Exp Bot* **60**, 3781–3796.
- Zhang, G., Chen, M., Chen, X., Xu, Z., Li, L., Guo, J., and Ma, Y.** (2010). Isolation and characterization of a novel EAR-motif-containing gene *GmERF4* from soybean (*Glycine max* L.). *Mol Biol Rep* **37**, 809–818.
- Zhang, G., Chen, M., Chen, X., Xu, Z., Guan, S., Li, L.C., Li, A., Guo, J., Mao, L., and Ma, Y.** (2008). Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (*Glycine max* L.). *J Exp Bot* **59**, 4095–4107.
- Zhang, H., Huang, Z., Xie, B., Chen, Q., Tian, X., Zhang, X., Lu, X., Huang, D., Huang, R.** (2004a). The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco. *Planta* **220**, 262–270.
- Zhang, H., Yang, Y., Zhang, Z., Chen, J., Wang, X.C., and Huang, R.** (2008b). Expression of the ethylene response factor gene *TSRF1* enhances abscisic acid responses during seedling development in tobacco. *Planta* **228**, 777–787.
- Zhang, J.Y., Broeckling, C.D., Sumner, L.W., and Wang, Z.Y.** (2007a). Heterologous expression of two *Medicago truncatula* putative ERF transcription factor genes, *WXP1* and *WXP2*, in *Arabidopsis* led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance. *Plant Mol Biol* **64**, 265–278.
- Zhang, X., Fowler, S.G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S.Y., Stockinger, E.J.,**

- Thomashow, M.F.** (2004b). Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant J* **39**, 905–919.
- Zhang, Z., Yao, W., Dong, N., Liang, H., Liu, H., and Huang, R.** (2007b). A novel ERF transcription activator in wheat and its induction kinetics after pathogen and hormone treatments. *J Exp Bot* **58**, 2993–3003.
- Zhang, Z., Zhang, H., Quan, R., Wang, X.C., and Huang, R.** (2009). Transcriptional regulation of the ethylene response factor LeERF2 in the expression of ethylene biosynthesis genes controls ethylene production in tomato and tobacco. *Plant Physiol* **150**, 365-377.
- 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.
- Zhuang, J., Cai, B., Peng, R.H., Zhu, B., Jin, X.F., Xue, Y., Gao, F., Fu, X.Y., Tian, Y.S., Zhao, W., Qiao, Y.S., Zhang, Z., Xiong, A.S., and Yao, Q.H.** (2008). Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. *Biochem Biophys Res Commun* **371**, 468–474.
- Zhu, J.K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 247-273.
- Zuo, K.J., Qin, J., Zhao, J.Y., Ling, H., Zhang, L.D., Cao, Y.F., and Tang, K.X.** (2007) Over-expression *GbERF2* transcription factor in tobacco enhances brown spots disease resistance by activating expression of downstream genes. *Gene* **391**, 80–90.

表一、番茄 *SlERF B1a* 基因群其上游 3000 bp 啟動子區域之 putative *cis-elements* 與數目。

Class ^a	Description ^b	Cis-elements ^c	Copy numbers ^d				
			<i>B1a-1</i>	<i>B1a-2</i>	<i>B1a-3</i>	<i>B1a-4</i>	<i>B1a-5</i>
Biotic stress	Defense response	TC-rich repeat	2	2	2	-	3
	fungal elicitor	Box-W1	1	-	-	-	-
Abiotic stress	Low temperature response	LTR	-	-	1	1	-
	Drought response	MBS(Myb binding site)	-	-	1	1	-
	Wounding response	W-box	1	-	-	2	4
	Anaerobic induction	ARE	1	2	1	-	-
	Heat stress response	HSE	2	-	-	-	-
Development	Endosperm expression	Skn-1 motif	3	4	1	1	-
	Light-regulated	G-box	3	-	1	2	1
	Pollen specific expression	AGAAA	7	6	5	-	-
Hormones	Ethylene response	ERE	1	1	1	2	1
	Salicylic acid response	TCA-element	2	2	2	-	-
	MeJA response	TGACG-motif	1	2	-	-	-
	ABA response	ABRE	2	-	-	-	1
	Gibberellin response	GARE-motif	-	-	-	2	-
	Auxin response	TGA-element	1	-	-	-	1

^a表示功能分類成生物、非生物逆境、生長發育與荷爾蒙誘導；^b表示描述啟動子的相關誘導啟動功能

^c表示該表示蛋白質結合啟動子序列之名稱；^d表示該 *cis-elements* 在啟動子區域出現次數。

表二、VIGS 基因靜默所使用之引子及所用片段之基因靜默專一性。

Unigene Number ^a	Gene-Specific Primers	Fragment Length ^b (bp)	Paralogue ^c [Accession No., nucleotide identity %, identical length (bp)]
<i>SIERF B1a-1</i> (SGN-U581852)	F: 5'-ACCCGATCTTACACCAGCAGC-3' R: 5'-CAGCCATTAGCTCTGTCACT-3'	317	—
<i>SIERF B1a-2</i> (SGN-U575863)	F: 5'-AAGACTCGAGTTTGGCTGGG-3' R: 5'-GCATTCCTCCATCGGACGAA-3'	285	(SGN-U571820, 84%, 23)
<i>SIERF B1a-3</i> (SGN-U574883)	F: 5'-CTCGTAAATGGCTGGGAACG-3' R: 5'-CACAATCACTATGACCTTCC-3'	282	—
<i>SIERF B1a-4</i> (SGN-U564953)	F: 5'-AGGTGGATGGATCAGTGTAT-3' R: 5'-GTCACAAACCATCATTTCGT-3'	238	—
<i>SIERF B1a-5</i> (SGN-U564952)	F: 5'-TGCTATGAATCTGTTGCTGG-3' R: 5'-CAACGACACTAGAGCTATCA-3'	245	—

^a表示此 5 個番茄的 unigene 編號是以 SIERF3 的胺基酸序列為模板，利用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 方式在 SGN (Solanaceae genomics network) 資料庫 (<http://solgenomics.net/index.pl>) 比對到番茄中相似的胺基酸序列。

^b利用番茄 cDNA 所擴增的 VIGS 片段 (長度測量以 base pair, bp 為單位)

^c指的是在同物種間序列相似的基因。Accession number：表示所比對到的基因序碼，Nucleotide identity %：表示與該基因之間相似的程
度，Identical length：表示與該基因相似的最長連續片段長度，—：此符號表示沒有比對到相似的 paralogue 基因。

表三、番茄抗青枯病品系經 *SIERF B1a* 基因群靜默後植株內青枯病菌量增生情形。

Silenced Genes	Plant no. ^a	Mean ^b (log [CFU/gram plant tissue])			
		Stembase		Mid-Stem	
<i>SIERF B1a-1</i> (SGN-U581852)	36	8.17	** ^c	7.63	**
<i>SIERF B1a-2</i> (SGN-U575863)	36	7.65	**	6.52	*
<i>SIERF B1a-3</i> (SGN-U574883)	36	5.95	ns ^c	5.55	ns
<i>SIERF B1a-4</i> (SGN-U564953)	36	6.58	*	6.09	ns
<i>SIERF B1a-5</i> (SGN-U564952)	36	7.40	**	6.62	*
TRV-infected ^d	48	4.88		4.78	
L390 ^e	24	10.08		9.8	

^a 表示至少三次不同的實驗中集合所有被基因靜默的 H7996 植株數量。

^b *R. solanacearum* 在每公克的番茄莖基部中所增生的細菌數量用 Log 以 10 為底表示其平均數值 (log [CFU/gram plant tissue])。

^c 利用 Student's *t*-test 的統計方法分析 TRV-infected 與 TRV::*SIERF B1a* 互相比較是否有差異。**, highly significant ; *, significant ; ns, not significant.

^d 接種農桿菌攜帶 pTRV1 與 empty pTRV2 vector 的番茄檢測菌量，做為未靜默任何基因的對照組。

^e 番茄感青枯病品系 L390 作為接種 *R. solanacearum* 是否成功的對照組。

表四、番茄 *SIERF B1a* 基因群在阿拉伯芥中的 ortholog 基因。

Tomato	Arabidopsis ^a ortholog	Identity ^b (a.a.)	Similarity ^c (a.a.)
<i>SIERF B1-a</i> 1 (SGN-U581852)	<i>At5g44210</i>	34.3%	44.5%
<i>SIERF B1-a</i> 2 (SGN-U575863)		37.8%	44.8%
<i>SIERF B1-a</i> 3 (SGN-U574883)	<i>At3g20310</i>	40.4%	48%
<i>SIERF B1-a</i> 4 (SGN-U564953)		56%	65.1%
<i>SIERF B1-a</i> 5 (SGN-U564952)	<i>At1g50640</i>	53.3%	59.5%

^a 番茄 *SIERF B1-a* 基因群在阿拉伯芥中相似的 ortholog 分別對應到 *At5g44210*、*At3g20310* 與 *At1g50640* 三個基因。

^b 胺基酸序列 identity 的相同程度。

^c 胺基酸序列 similarity 的相似程度。



表五、利用生物資訊進行阿拉伯芥基因的微陣列分析。

分析番茄 *SIERF B1a* 基因群在阿拉伯芥中之 homolog 基因，於生物及非生物逆境下的反應。

<i>Arabidopsis</i> homolog of <i>SIERF B1a</i>			
Conditions	<i>At5g44210</i>	<i>At3g20310</i>	<i>At1g50640</i>
Biotic stress			
<i>Phytophthora infestans</i> (late blight)	2.21	1	-1.19
<i>Pseudomonas syringae</i> (leaf spot)	3.74	1.13	1.95
<i>Pseudomonas syringae</i> avrRpm1	-2.6	1.15	2.09
<i>Botrytis cinerea</i> (Gray mold)	2.01	-1.14	0.95
<i>Blumeria graminis</i> (Powdery mildew)	-2.6	1.18	1.35
Cabbage leaf curl virus (CaLCuV)	2.14	-1.02	1.03
<i>Heterodera glycines</i> (Cyst nematode)	-2.4	-1.2	1.2
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	-2.5	1.21	1.22
Pathogen elicitor			
Flagellin 22 (Flg22)	5.59	1.14	1.11
Chitin	-1.7	1.22	1.22
Lipopolysaccharide (LPS)	2.58	-1.12	0.96
Harpins Z (Hrp Z)	2.62	1.13	1.17
Abiotic stress			
Drought	2.15	2.1	2
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	3.7	1.02	0.94
Cold	4.45	1.3	1.3
Heat	-7.1	-1.04	1.33

—：表示與對照組比較後表現量下降之倍數。

續表五、利用生物資訊進行阿拉伯芥基因的微陣列分析。

分析番茄 *SIERF B1a* 基因群在阿拉伯芥中之 homolog 基因，對於植物荷爾蒙處理，以及參與植物防禦的 SA、JA、ET、MAPK 訊息傳導途徑與 microRNA 的突變體的反應。

<i>Arabidopsis</i> homolog of <i>SIERF B1a</i>			
Conditions	<i>At5g44210</i>	<i>At3g20310</i>	<i>At1g50640</i>
Hormones			
Ethylene (ET)	10.02	-1.04	1.16
Methyl Jasmonate (MeJA)	-2.33	1.02	1.36
Salicylic acid (SA)	1.02	1.13	-1.2
Abscisic acid (ABA)	2.66	1.28	2.39
Gibberellin (GA)	2.25	0.99	0.99
IAA	3.29	1.02	1.02
NAA	2.36	0.99	0.99
Zeatin	-2.87	1.06	2.77
Mutants			
<i>mkk1</i>	2.73	-1.02	1.29
<i>mkk2</i>	2.23	1.01	1.29
<i>mpk4</i>	1.02	-1.51	1.33
<i>npr1</i>	-2	-1.07	1.09
<i>sid2</i>	-23.25	1.01	1
<i>aba1-1</i>	2.88	-1.35	1.39
<i>abi1-1</i>	2.81	-1.39	1.03
<i>etr1</i>	-2.38	1.03	-1.02
<i>ein2</i>	-3.13	-1.01	1.05
<i>ctr1</i>	2	-1.55	1.01
<i>coi1</i>	-7.94	1.02	1.33
<i>miR172a</i>	-2.94	-1.12	1.34

—：表示與對照組比較後表現量下降之倍數。

(A)

```

SIERF3 (SGN-U515194)      .....-MAPKEKIG-----AVTAMAMVNL 18
SIERF B1a-1 (SGN-U581852) .....IGGQSAELTN SKNV SAPMAVKD-----KAVKGGNVKV 32
SIERF B1a-2 (SGN-U575963) HCQSALNLQTKQNHLPFHGKSAKKLKKYPKNPILILNSPAMRHRKSSSELKR-----PGSDLLQQP 60
SIERF B1a-3 (SGN-U574883) .....MPPRKNPEING-----SRSVVFQQS 20
SIERF B1a-4 (SGN-U564953) .....MRRSRAAAAARQVPATEVVPVAPVAGEHNG 30
SIERF B1a-5 (SGN-U564952) .....MRRGRATPAA-----AAAAVKPDG 19
At5g44210                  .....MAPRQANGRSIAVS-----EGGGGKMTM 24
At3g20310                  .....MRKGRGS-SVVG-----PALPVTAG 20
At1g50640                  .....MRKGRGSSAVAG-----PTVVAaing 21

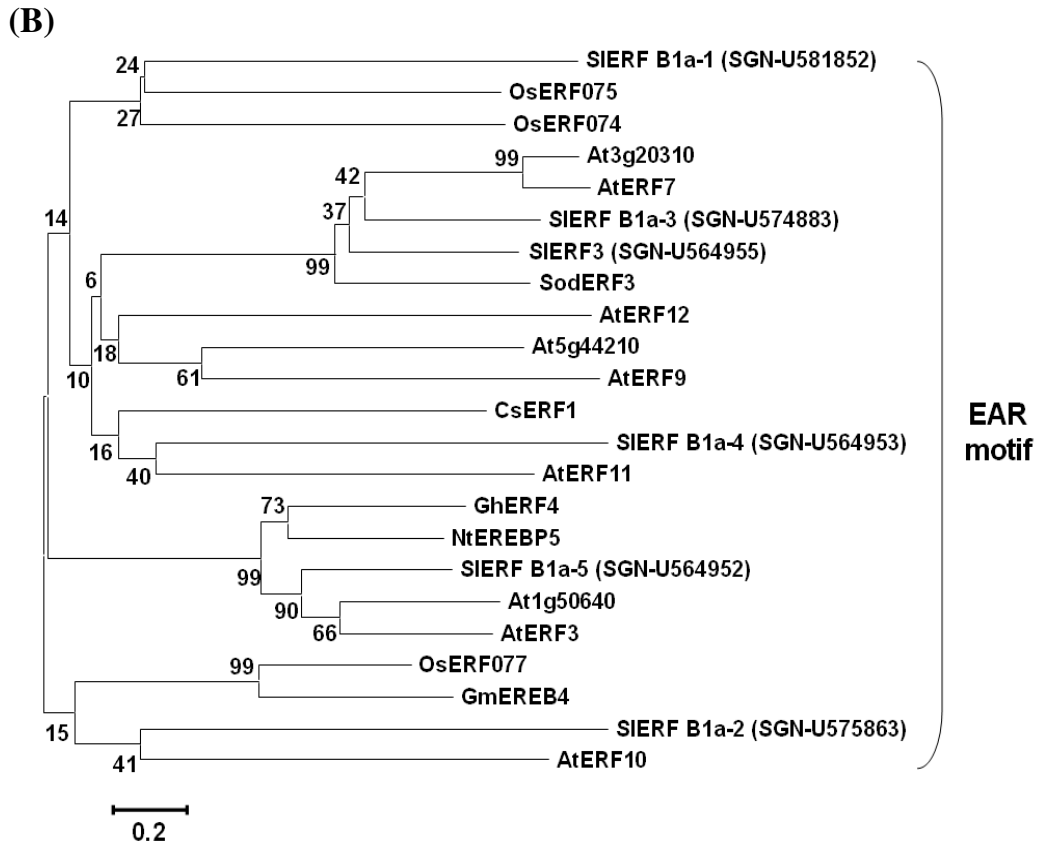
SIERF3 (SGN-U515194)      NGISKEVHYRGVRRKFMGRYAAEIRDPPKKSRVWLGTFDTAEAAARAYDAAAREFRGAKAKTNFPLEME 88
SIERF B1a-1 (SGN-U581852) NHGVKEVHYRGVRRKFMGRYAAEIRDPPKKSRVWLGTFDTAEAAARAYDAAAREFRGPKAKTNFPLFPAE 101
SIERF B1a-2 (SGN-U575963) D--ADPPRYRGVRRKFMGRFAAEIRDPIKKTRVWLGTFDTAEAAARAYDAAARALRGAKAKTNFNLMLP-- 126
SIERF B1a-3 (SGN-U574883) V--IEPPRYRGVRRKFMGRFAAEIRDPPKKSRVWLGTFDTAEAAARAYDAAARALRGAKAKTNFPLP-- 86
SIERF B1a-4 (SGN-U564953) SGGSKERFRGVRRKFMGRFAAEIRDPPKKSRVWLGTFDTAEAAARAYDAAARALRGPKAKTNFPLPSS-- 99
SIERF B1a-5 (SGN-U564952) SGGLKEVFRGVRRKFMGRFAAEIRDPPKKSRVWLGTFDTAEAAARAYDAAARALRGPKAKTNFPLP-- 86
At5g44210                  TTMRKEVHYRGVRRKFMGRYAAEIRDPPKKSRVWLGTFDTAEAAARAYDAAAREFRGPKAKTNFPLPGE 93
At3g20310                  S--VKEPRYRGVRRKFMGRFAAEIRDPLKKSRVWLGTFDTAEAAARAYDAAARALRGPKAKTNFPLDCS-- 87
At1g50640                  S--VKEPRFRGVRRKFMGRFAAEIRDPPKKSRVWLGTFDTAEAAARAYDAAARALRGPKAKTNFPLDSSS 89

SIERF3 (SGN-U515194)      KEEDLKFVAVKNEIMRSPSQTSTVES$SSPVMVD$SSPLDLSLGG$-----IGGFN---HHTVKFPP$SGGGF 150
SIERF B1a-1 (SGN-U581852) MNN-----VGNNNSQSPCGSSTVES$SGETVVAHPNXATRAAGAGSHRRLGAAAEGGRGGVGYPI LHQQP 166
SIERF B1a-2 (SGN-U575963) .....LTDDPY-----DDEFELFPN-----RPA$SSMSSTLES$SGPRG 161
SIERF B1a-3 (SGN-U574883) .....PYGE-----NDFENLQQ$-----RPA$SSMSSTVES$SDARA 118
SIERF B1a-4 (SGN-U564953) HHLP-PYPHHHQFNDS-----INPNDPFVD$RLYS-----QDHLV$QRPT$SSMSSTVES$SGPXA 155
SIERF B1a-5 (SGN-U564952) .....MYSQHHQFNRS-----LNPNDRLVD$RLYS-----QEAPIICQRPT$SSMSSTVES$SGP-E 137
At5g44210                  $TT-----VNDGGEND$YVNR$TTVTAREMTRQ-----FPFACHRE 130
At3g20310                  P$SP-LQPLTYLHNQNLCSPPVIGNQIDPFMDHRLYGGGNFQEQQQQQIIIRPA$SSMSSTVKS$SGPRP 156
At1g50640                  PPPP-NLRFNQRINQN-----GNQVDFMDHRLFT-----DHQQQFPIVNRPT$SSMSSTVES$SGPRP 147

SIERF3 (SGN-U515194)      TGSVQAVNH-----MYIEALARAGVIKLETNRK-KTVDYLGGGD-----SDSSTVI$DFMRVDVKSTT 207
SIERF B1a-1 (SGN-U581852) TVAVLPNGQP-----VLLFD$MVRPGVVSRPYQVVPATMEFAGVVGAGVVT$VSD$SVVEEKHYGKK--- 228
SIERF B1a-2 (SGN-U575963) G$S$K$VTR-----MKIPR-PPVRPEECRSDCD$SS$SVVD$RC-----D$VDQT$S$FVTK 208
SIERF B1a-3 (SGN-U574883) LCKTMQPR-----IEIPR-RI-PMGEHSDCD$SS$SVVDGNCIGGG-----GDDQT$S$FC-K 169
SIERF B1a-4 (SGN-U564953) AAAAADG$FR-----AFQKDP$PPVVPDDCHSDCD$SS$SVVEDGEC-----NDNIAS$S$FRK- 209
SIERF B1a-5 (SGN-U564952) TAT$ANGGF-----AFEKNPR$PPVEPDDCRSDCD$SS$SVVEDGCEGG-----NDNIAS$S$LRN- 192
At5g44210                  RKVVGGYAS$-----GFFFD$P$RAASLRAELSRVCPVRFDPNTEL-----SIGIRETVKVEPR-- 185
At3g20310                  MEAAAAS$SVAKPLHAIKRYPRTPPVAPEDCHSDCD$SS$SVTD-----GDDIAS$S$SRK 212
At1g50640                  TTMKPATT-----KRYPRTPPVVPEDCHSDCD$SS$SVIDD-----D$DIAS$S$SRN 194

SIERF3 (SGN-U515194)      *k*o*k*k*k*
AGLNL$DLN$FPP$ENM----- 222
SIERF B1a-1 (SGN-U581852) -GL$DLN$LAATYGS$LN----- 244
SIERF B1a-2 (SGN-U575963) QPLPFDLN$LPPP$DNDGVVDV---DDLHV$TALCLX----- 239
SIERF B1a-3 (SGN-U574883) DPLPFDLN$FPP$SD-----DFQIITPLCF----- 193
SIERF B1a-4 (SGN-U564953) -PLPFDLN$PAP$DDF$ADAY-ADDLPAQHYVFDEMMVCDPPVI 251
SIERF B1a-5 (SGN-U564952) -PLPFDLN$FPP$DDVYANS---NDLYC$TALCL----- 221
At5g44210                  -ELNLDLN$LAPPVVDV----- 200
At3g20310                  TPFQFDLN$FP$PLD$VDL$FAGGI$DDLHC$TDLRL----- 244
At1g50640                  PPFQFDLN$FP$PLD$VDL$FNG-ADDLHC$TDLRL----- 225

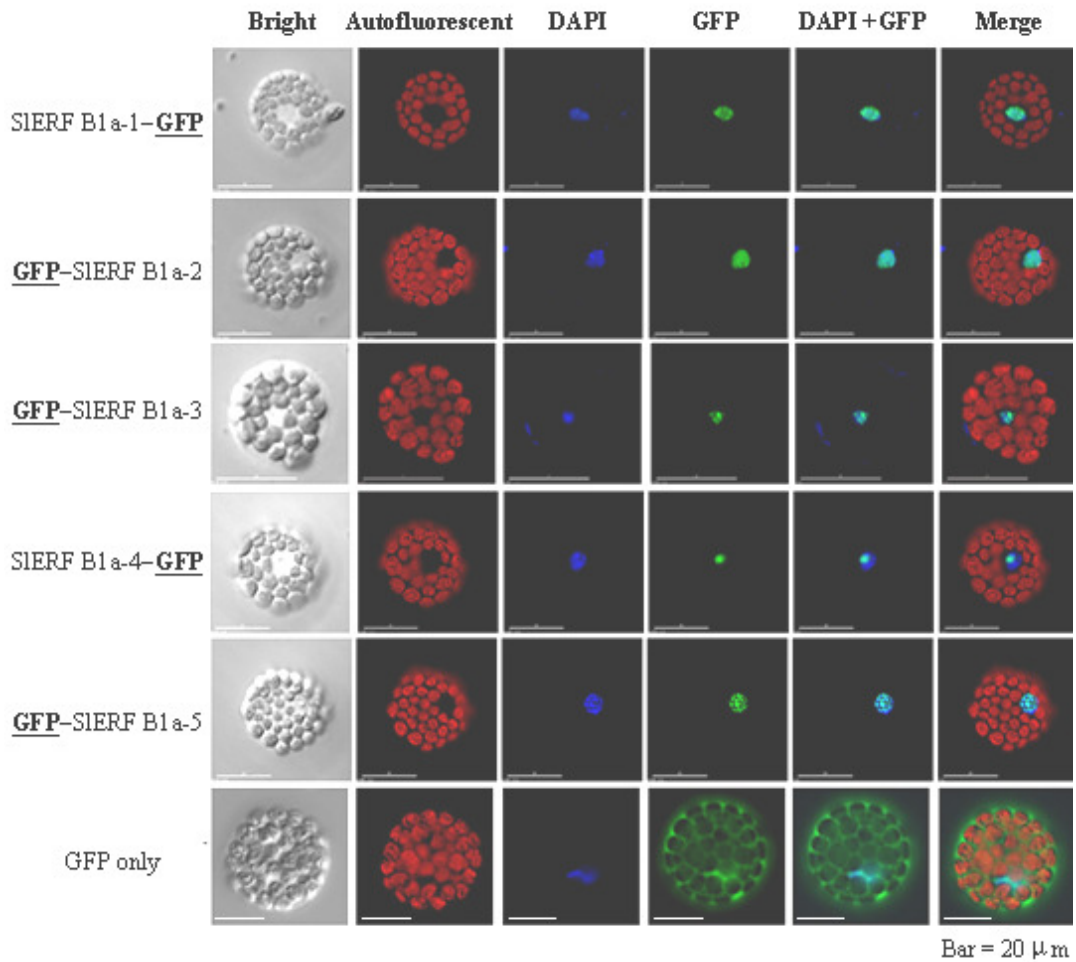
```



圖一、番茄 *SIERF B1-a* 基因群與阿拉伯芥之胺基酸序列比對與親緣分析。

(A) 胺基酸序列比對使用的軟體為 “Clustal W program of bioedit software (Tom Hall, USA)，蛋白質保守序列之預測是使用 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)，黑色底線所標示為 Pfam 網站預測到的 AP2/ERF domain；在胺基酸 C 端用星號 (*) 標示則為 EAR motif (ERF-associated amphiphilic repression)；黑色實心圓型 (●) 所標示為 bipartite NLS (Nuclear localization signal) 序列則為 ELM (Eukaryotic Linear Motif) 網站所預測到。黑色表示 identity，灰色表示 similarity。

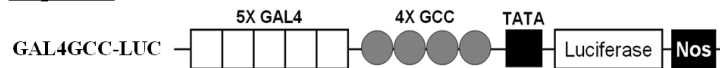
(B) 利用 MEGA4.0 程式進行 neighbor-joining 演化樹分析，比較 SIERF3、SIERF B1-a 基因群與阿拉伯芥中相似的 At5g44210、At3g20310 與 At1g50640 三個蛋白質，以及不同物種 (包含 Arabidopsis, rice, soybean, tobacco, upland cotton, cucumber 與 sugarcane) 含有 EAR motif 的 ERF 蛋白之親緣關係。數值代表 Bootstrap 的結果，數字越小表示序列相似度越小，樹狀直線距離越長則代表序列之間的歧異度越大。



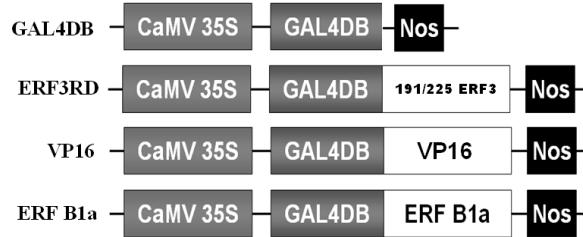
圖二、SIERF B1a 蛋白之表現位置。

Bright：白光下之細胞影像；Autofluorescent：葉綠體之自發紅色螢光；DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)：能與細胞核的核酸物質結合並激發藍色螢光；GFP：綠色螢光蛋白與目標 SIERF B1a 蛋白融合之重組蛋白；DAPI+GFP：重疊兩種激發螢光之影像；Merge：重疊影像。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。

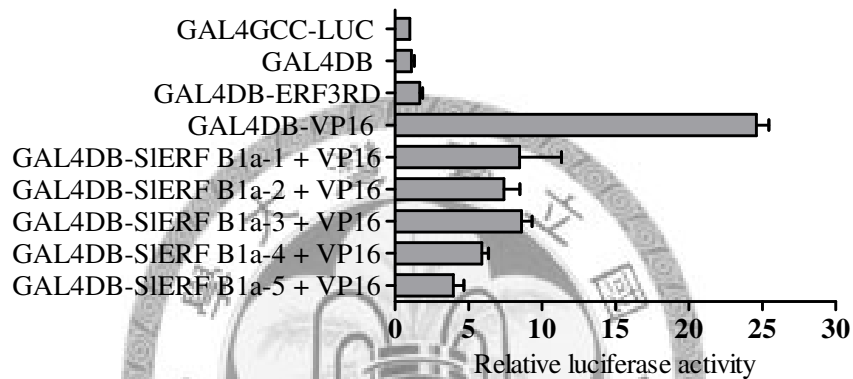
(A) Reporter



Effector



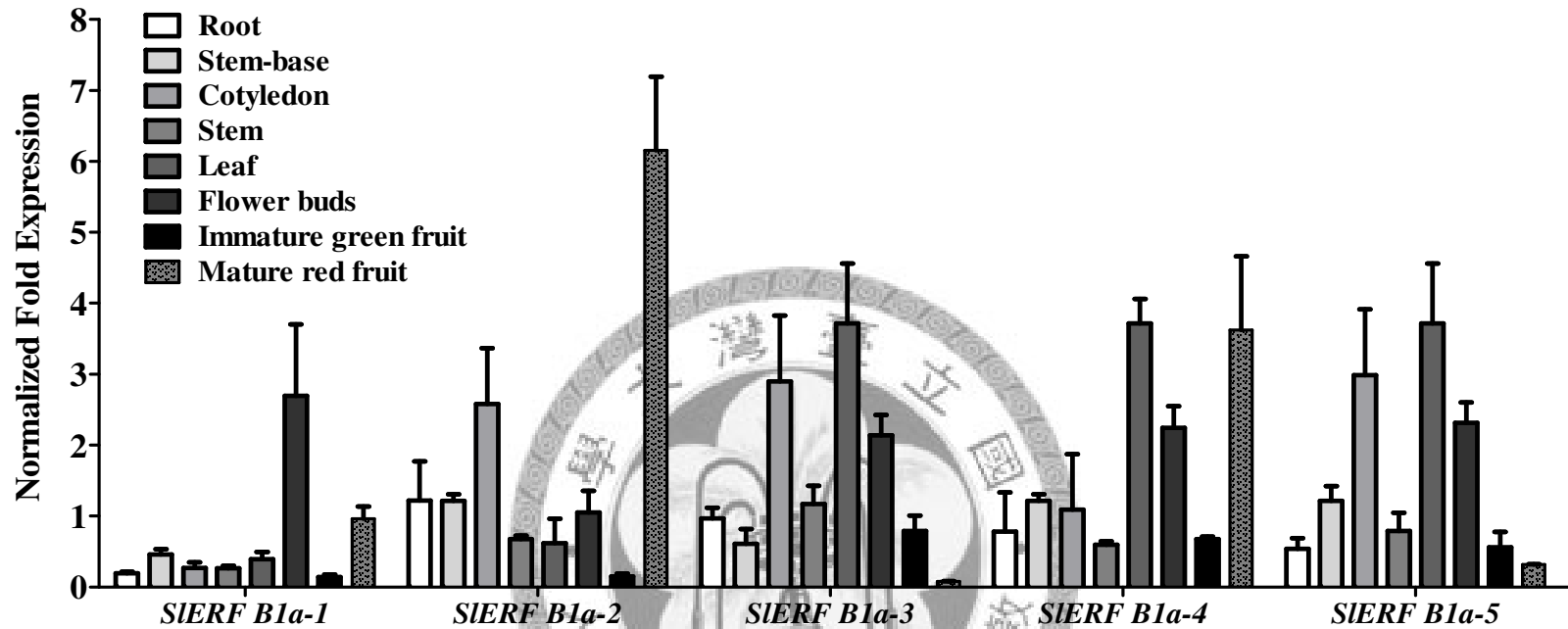
(B)



圖三、*SIERF B1a* 基因群轉錄活性分析。

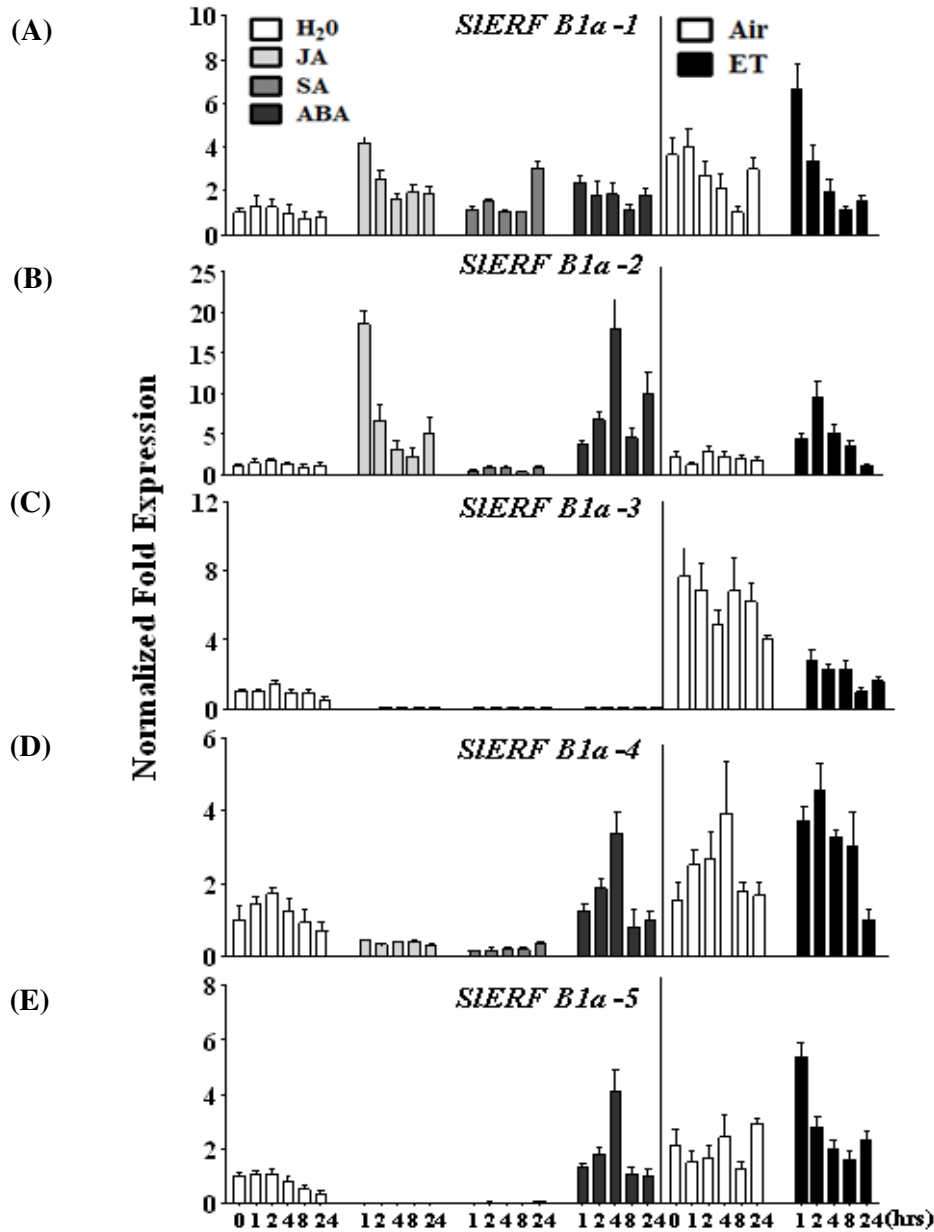
(A) Reporter 與 Effector 表現載體之構築圖示。

(B) 檢測 reporter 與 effector 載體結合，表現出相對 luciferase 的蛋白質酵素活性。利用只有單獨表現 VP16 的活性，進一步比較共同表現 SIERF-B1a 與 VP16 的活性。本實驗三次重複結果一致，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.)。



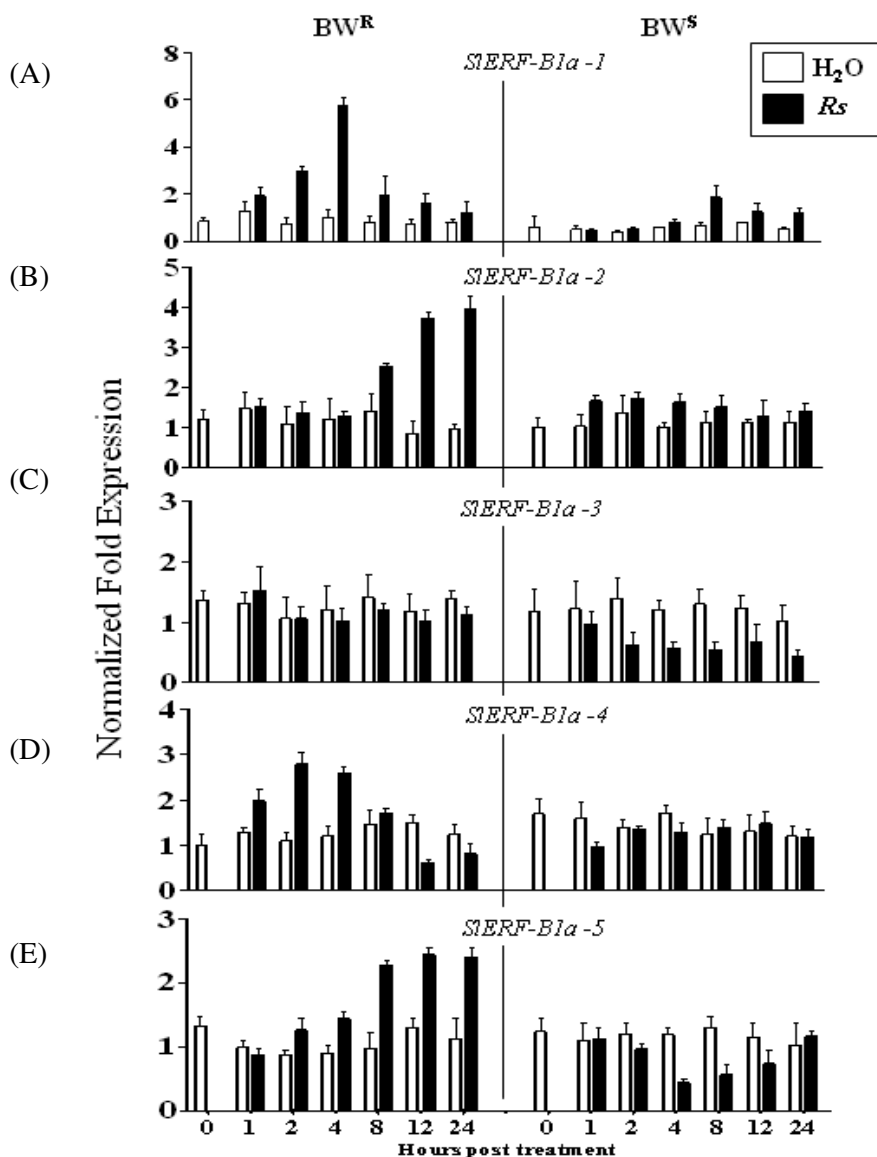
圖四、*SIERF B1a* 基因群於 H7996 番茄組織之表現情況。

所收取的組織為生長 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)。Real-time PCR 的 internal control 為 *elongation factor 1 a (EF1a)*，各個組織 *SIERF B1a* 的表現量以 *EF1a* 為基準，計算成標準化之表現量後進行比較，Y 軸表示基因的標準化表現量，X 軸表示各個部位的組織。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。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。



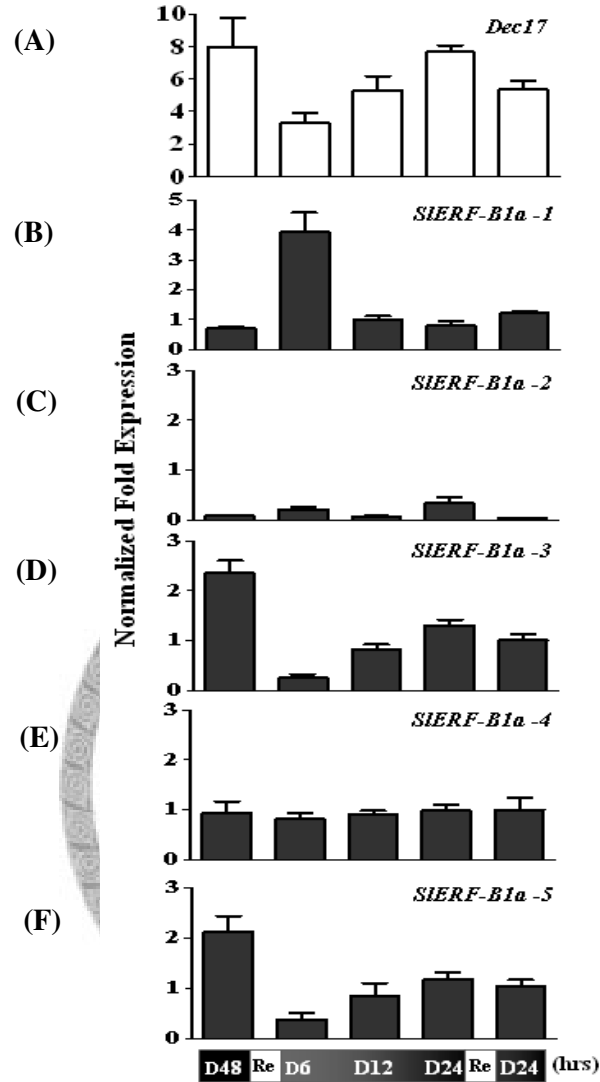
圖五、*SIERF B1a* 基因群於 H7996 番茄處理植物荷爾蒙後的表現情況。

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。Real-time PCR 的 internal control 為 *elongation factor 1 a (EF1a)*，各個時間點 *SIERF B1a* 的基因表現量以 *EF1a* 為基準，計算成標準化之表現量後進行比較，Y 軸表示基因的標準化表現量，X 軸表示處理植物荷爾蒙後的各個時間點。本實驗重複 2 次，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.)。



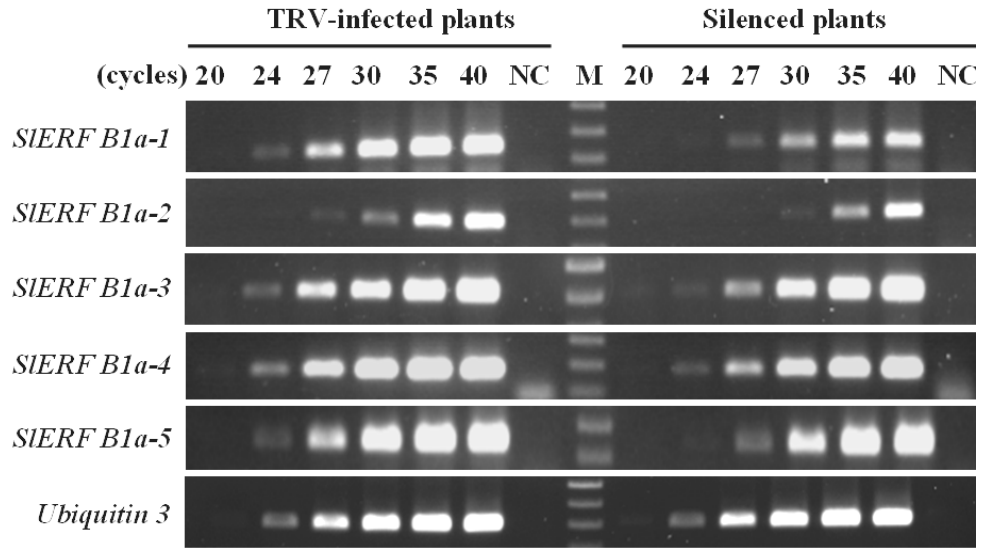
圖六、*SIERF Bla* 基因群於抗/感病品系接種青枯病菌後之表現情況。

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。Real-time PCR 的 internal control 為 *elongation factor 1 a (EF1a)*，各個時間點 *SIERF Bla* 的表現量以 *EF1a* 為基準，計算成標準化之表現量後進行比較。Y 軸表示基因的標準化表現量，X 軸表示處理青枯病菌後的各個時間點，本實驗重複 2 次，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.)。



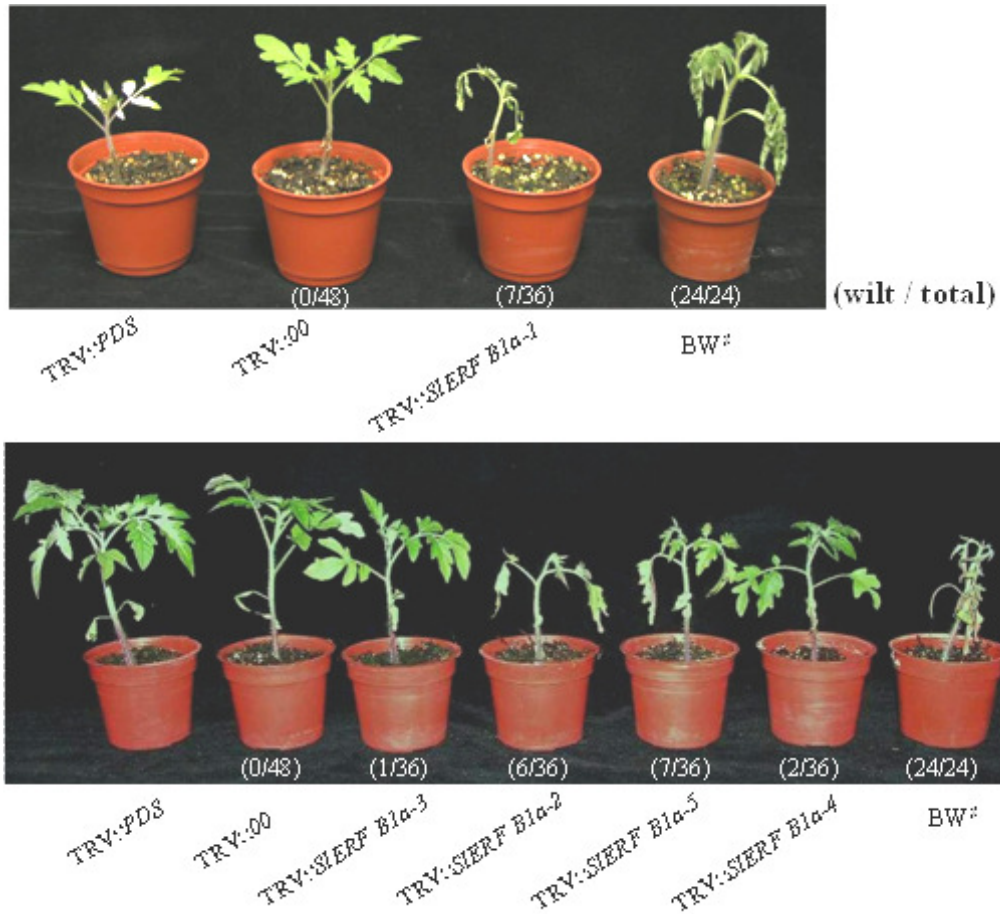
圖七、*SIERF B1a* 基因群於 H7996 番茄品系乾旱逆境後之表現情況。

將三周大番茄進行乾旱處理，如圖下方所示 D 代表乾旱 (Drought)，黑色漸層表示其乾旱之程度，Re 代表回水 (re-water)，分別收取五個時間點的莖基部組織進行基因檢測。Real-time PCR 的 internal control 為 *elongation factor 1a* (*EF1a*)，各個時間點的表現量以 *EF1a* 為基準，計算成標準化之表現量後進行比較。Y 軸表示基因的標準化表現量，X 軸表示乾旱處理後的各個時間點，本實驗重複 2 次，趨勢一致。本實驗重複 2 次，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.)。



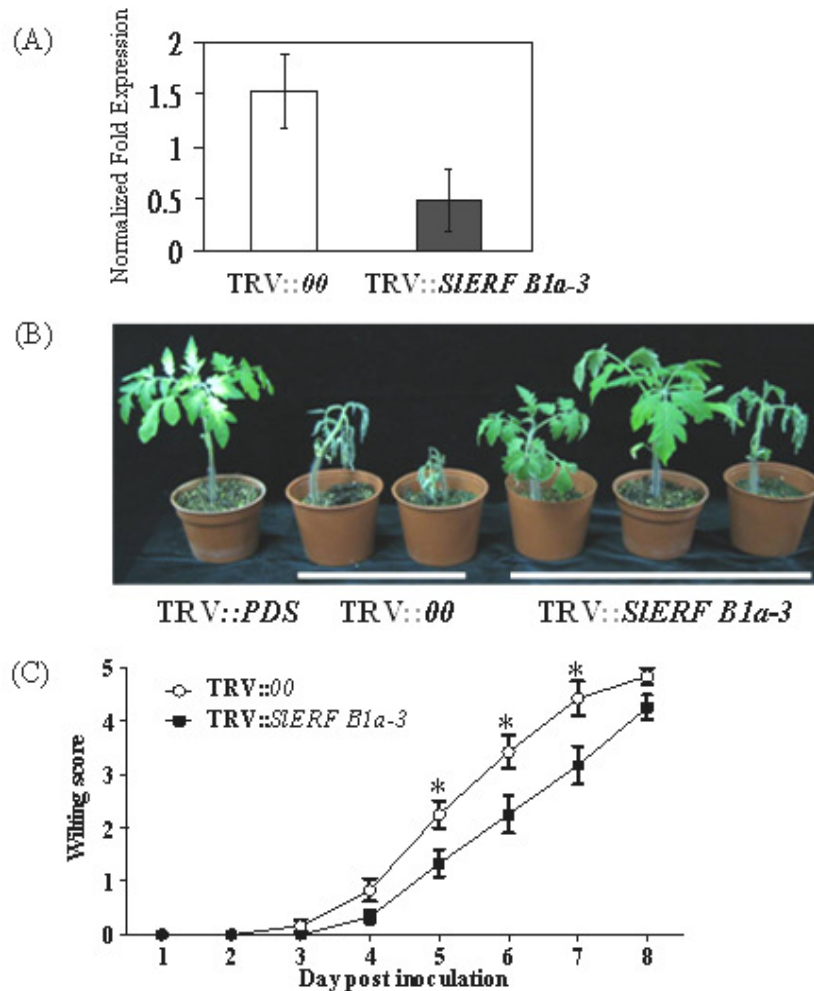
圖八、半定量 RT-PCR 檢測 *SIERF B1a* 基因群之靜默效率。

農桿菌 GV3101 strain 攜帶 pTRV1 以及 pTRV2-targeted genes (silenced) 或 pTRV2 空載體 (TRV-infected) 注射至 H7996 番茄後第 15 天，收取其莖基部分析基因靜默的效率。本實驗已重複兩次且得到一致性的結果，在此只呈現具代表性的一次結果。*Ubiquitin 3* 為 RNA 定量的控制組。NC 表示 negative control 為反轉錄前的 RNA 進行 PCR 以驗證沒有 DNA 污染。M:DNA ladder。



圖九、番茄抗病品系中靜默 *S1ERF Bla* 基因群後檢測抗青枯病能力。

TRV::*PDS* (phytoene desaturase) 基因靜默後番茄葉部出現白化外表型，做為測試 VIGS 效率優劣的對照組，TRV::00 表示空載體，(wilt/total) 表示總共靜默的植物中在接菌後所觀察到的萎凋植物數目，BW^S 表示青枯病感病品系 L390，其萎凋與否做為青枯病菌接種成功的對照組。每次實驗的植物數量為 12 棵，本實驗重複 3 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、番茄感病品系中靜默 *SIERF B1a-3* 基因後檢測抗青枯病能力。

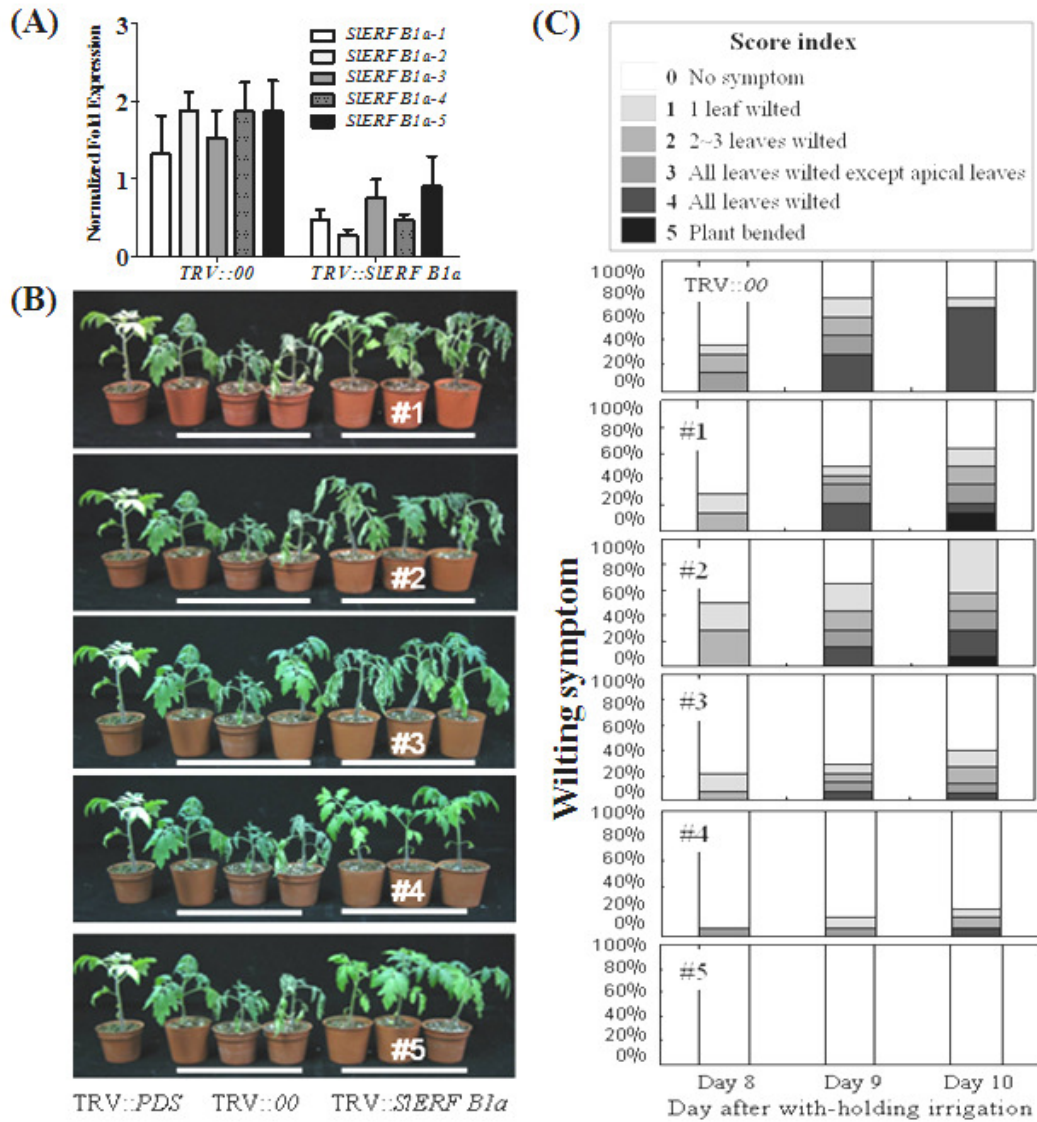
(A) 檢測 *SIERF B1a-3* 之基因靜默的效率。

(B) VIGS 後第十天接種青枯病菌 Pss4 strain ($OD_{600}=0.03$)，接種後第 7 天空載體與 *SIERF B1a-3* 基因的植株出現不同萎凋程度。

(C) 萎凋級數分級量化，比較靜默 *SIERF B1a-3* 與空載體萎凋的程度與時間。

TRV::*PDS* (phytoene desaturase) 基因靜默後番茄葉部出現白化外表型，做為測試 VIGS 效率優劣的對照組，TRV::00 (空載體)。

每次實驗的植物數量為 15 棵，本實驗重複 3 次，實驗結果趨勢一致，在此只呈現具代表性的一次結果，並以 Student's *t*-test 進行統計分析。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。



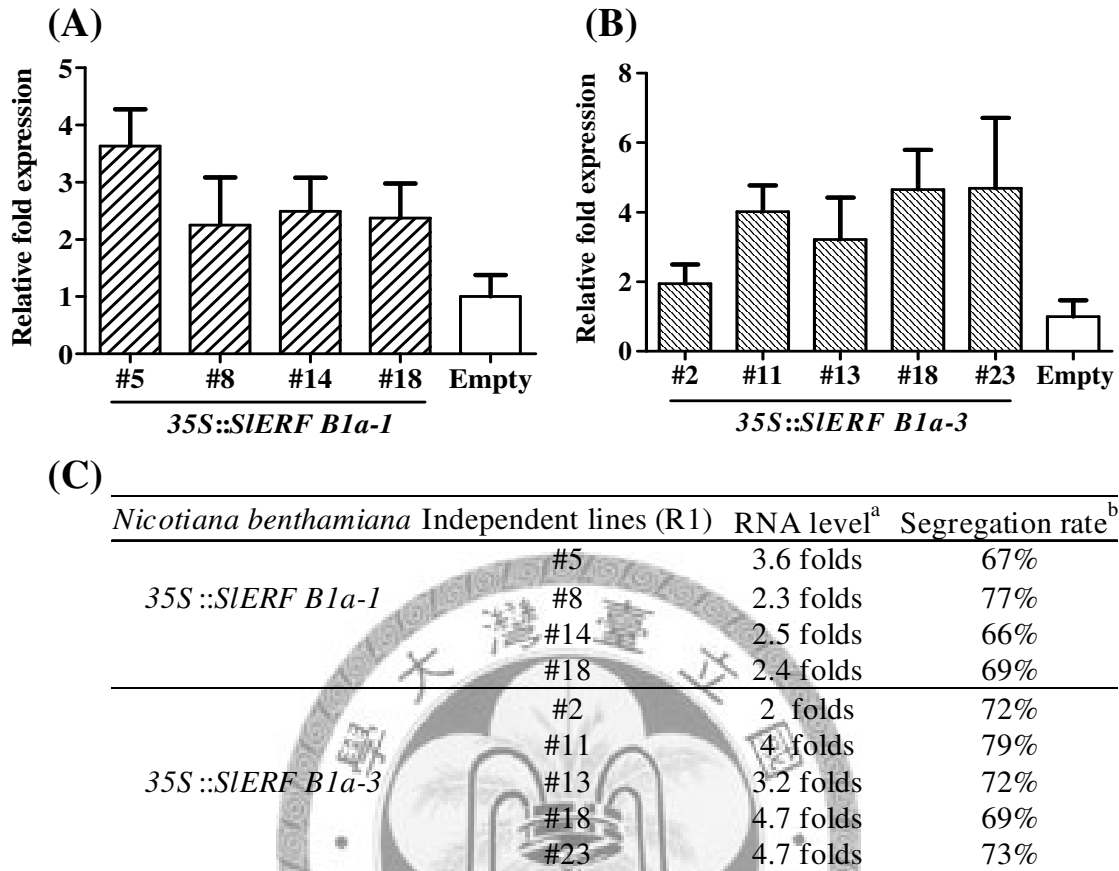
圖十一、靜默 H7996 番茄 *SIERF B1a* 基因群後植株之乾旱測試。

(A) 檢測 *SIERF B1a* 基因群之基因靜默的效率。

(B) 乾旱後第十天，植株乾旱萎凋的外表型。

(C) 乾旱萎凋程度分級量化。

每次實驗的植物數量為 15 棵，本實驗重複 3 次，實驗結果趨勢一致，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.)。



^a 檢測轉殖菸草與空載體之相對基因表現倍數；^b 菸草轉殖株 R1 世代的分離率

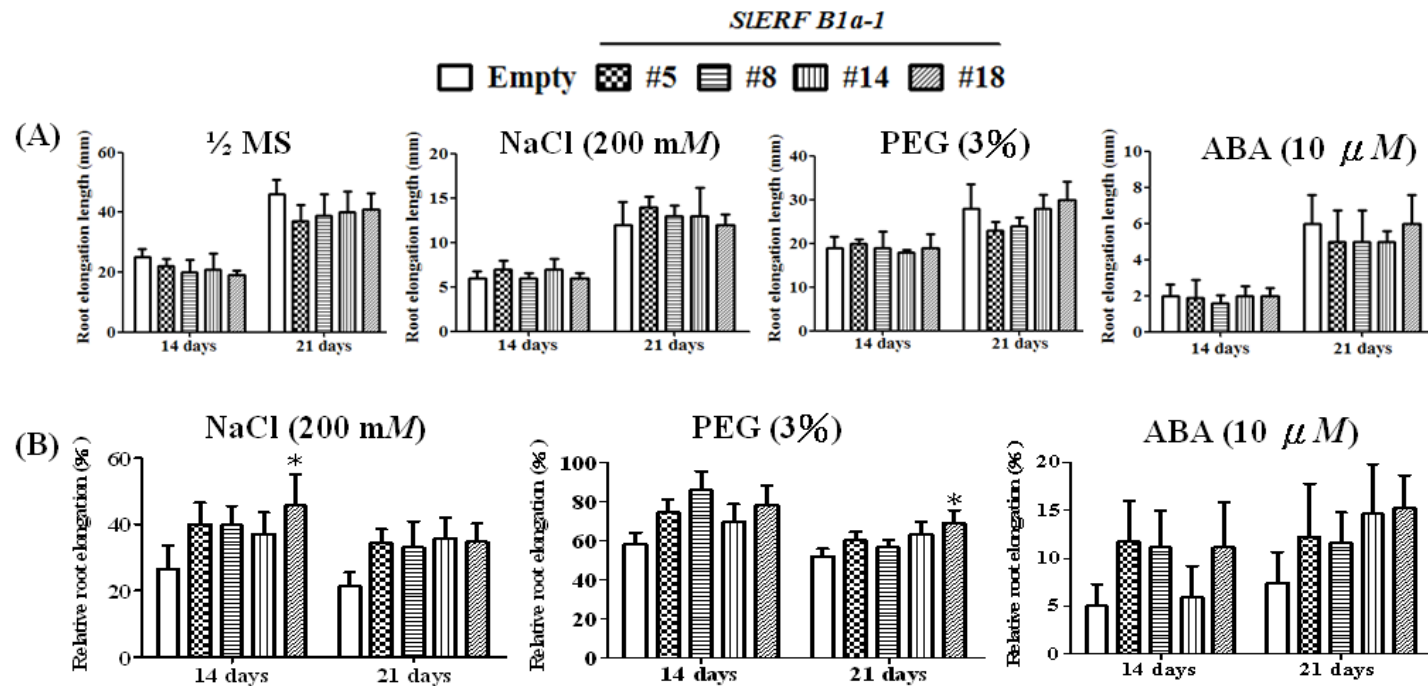
圖十二、檢測 35S::*SIERF B1a-1* 與 35S::*SIERF B1a-3* 轉殖菸草中基因之表現量與分離率。

(A) 利用 RT-qPCR 進行檢測過表現 *SIERF B1a-1* 基因 4 個獨立轉殖株 (independent lines) 中的 *SIERF B1a-1* 基因之表現量。

(B) 利用 RT-qPCR 進行檢測過表現 *SIERF B1a-3* 基因 5 個獨立轉殖株中的 *SIERF B1a-3* 基因之表現量。

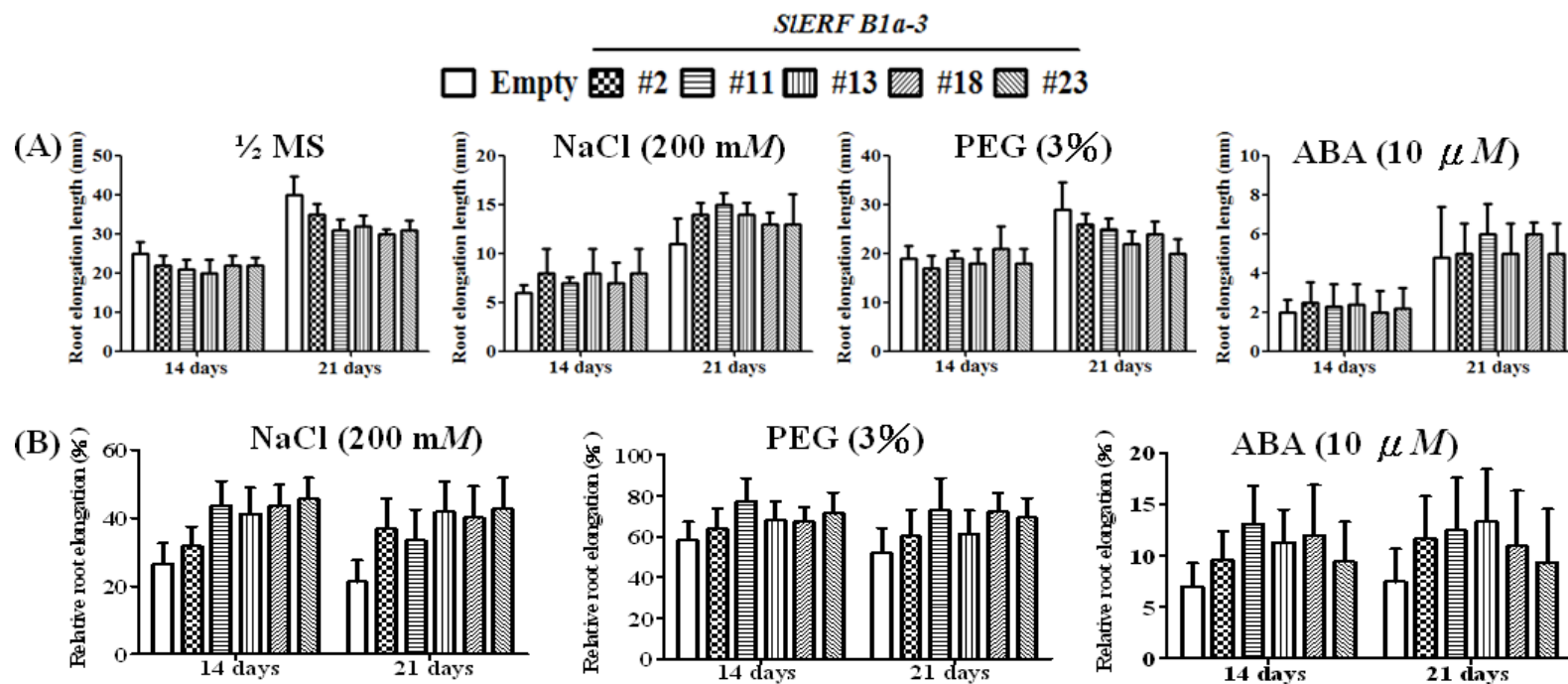
(C) 35S::*SIERF B1a-1* 與 35S::*SIERF B1a-3* 轉殖菸草其基因的表現倍數與 R1 世代的分離率。

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。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。



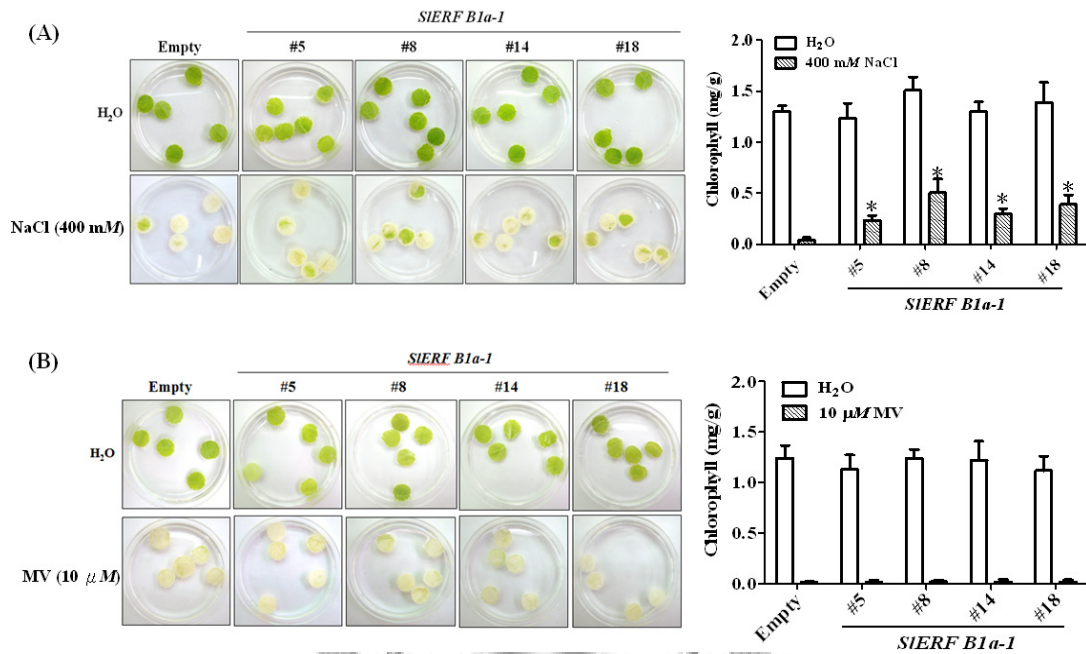
圖十三、菸草 *35S::SlERF B1a-1* 幼苗在非生物逆境之耐受性分析。

利用 hygromycin 篩選的幼苗移至帶有非生物逆境的培養基中，觀察植株在逆境以及正常環境中其根部延長之生長情形。(A) 在不同逆境中生長第 14 天與第 21 天其根部延長之長度。(B) 在不同逆境中生長第 14 天與第 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 進行統計分析後其 *p*-value 小於 0.05。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。



圖十四、菸草 *35S::SIERF B1a-3* 幼苗在非生物逆境之耐受性分析。

利用 hygromycin 篩選的幼苗移至帶有非生物逆境的培養基中，觀察植株在逆境以及正常環境中其根部延長之生長情形。(A) 在不同逆境中生長第 14 天與第 21 天其根部延長之長度。(B) 在不同逆境中生長第 14 天與第 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，以 Student's *t*-test 進行統計分析結果皆無顯著差異。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。

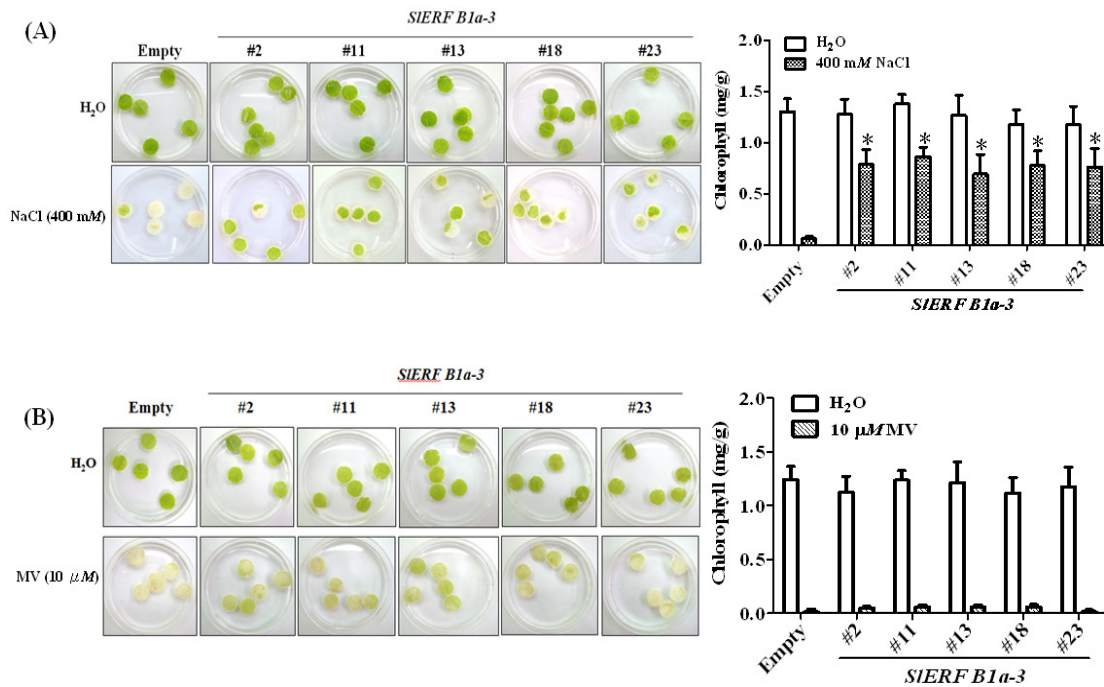


圖十五、菸草 35S::SIERF B1a-1 成株葉片對 NaCl 與氧化逆境之耐受性測試。

(A) 鹽分處理後 72 小時的四周大圓盤葉片 (leaf discs) 外表型及葉綠素量化結果。

(B) 氧化處理後 36 小時的四周大圓盤葉片外表型及葉綠素量化結果。

本實驗總共進行 2 重複，每次有 15 片圓盤葉片進行測試，實驗結果趨勢一致，在此只呈現具代表性一次結果，並且將處理組的空載體與轉殖株進行 Student's *t*-test 統計分析其中 * 表示 *p*-value 小於 0.05。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。

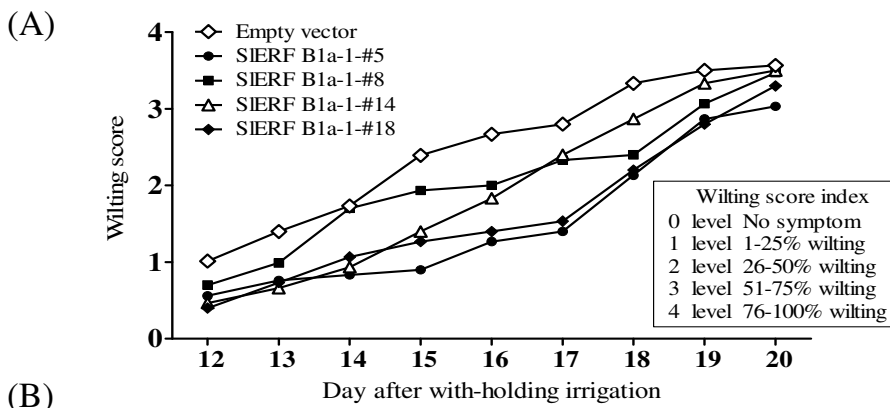


圖十六、菸草 35S::SIERF B1a-3 成株葉片對 NaCl 與氧化逆境之耐受性測試。

(A) 鹽分處理後 72 小時的四周大圓盤葉片 (leaf discs) 外表型及葉綠素量化結果。

(B) 氧化處理後 36 小時的四周大圓盤葉片外表型及葉綠素量化結果。

本實驗總共進行 2 重複，每次有 15 片圓盤葉片進行測試，實驗結果趨勢一致，在此只呈現具代表性一次結果，並且將處理組的空載體與轉植株進行 Student's *t*-test 統計分析其中 * 表示 *p*-value 小於 0.05。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。



(B)

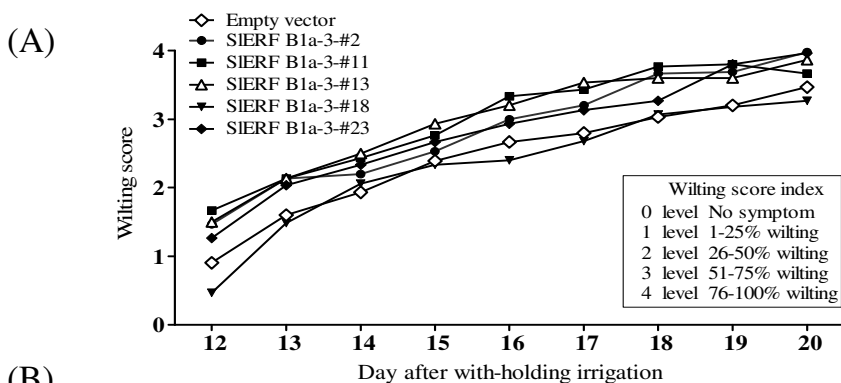
SIERF B1a-1 OE independent R1 line	20 DAHI ^a			
	Wilting (%) ^b	Wilting score ^c	Mean of RAUDPC ^d	Student's <i>t</i> -test ^e
Empty vector	89.17	3.57	2.23	
#5	75.83	3.03	1.33	*
#8	86.83	3.47	1.83	ns
#14	87.50	3.50	1.71	ns
#18	82.50	3.30	1.43	ns

^a停止灌溉後天數 (Day after with-holding irrigation, DAHI) ;
^b接種後平均之萎凋指數。
^c接種後平均之萎凋百分比。
^d相對乾旱曲線下面積 (Relative area under the drought progress curve, RAUDPC)。
^e Student's *t*-test 統計分析，* 表示 *p*-value 小於 0.05。

圖十七、菸草 *35S::SIERF B1a-1* 成株對乾旱之耐受性測試。

(A,B) 利用四週大的菸草 *35S::SIERF B1a-1* 成株，進行乾旱缺水逆境的測試，逐日觀察停止給水後其外表型的乾萎變化並進行量化。

每次實驗有 15 株，共 2 重複，實驗結果趨勢一致，在此只呈現具代表性一次結果。



(B)

SIERF B1a-3 OE independent R1 line	20 DAHI ^a			
	Wilting (%) ^b	Wilting score ^c	Mean of RAUDPC ^d	Student's <i>t</i> -test ^e
Empty vector	86.67	3.47	2.01	
#2	99.42	3.98	2.57	ns
#11	97.17	3.89	2.70	ns
#13	96.67	3.87	2.69	*
#18	88.17	3.53	2.12	ns
#23	99.17	3.97	2.53	ns

^a停止灌溉後天數 (Day after with-holding irrigation, DAHI)。

^b接種後平均之萎凋指數。

^c接種後平均之萎凋百分比。

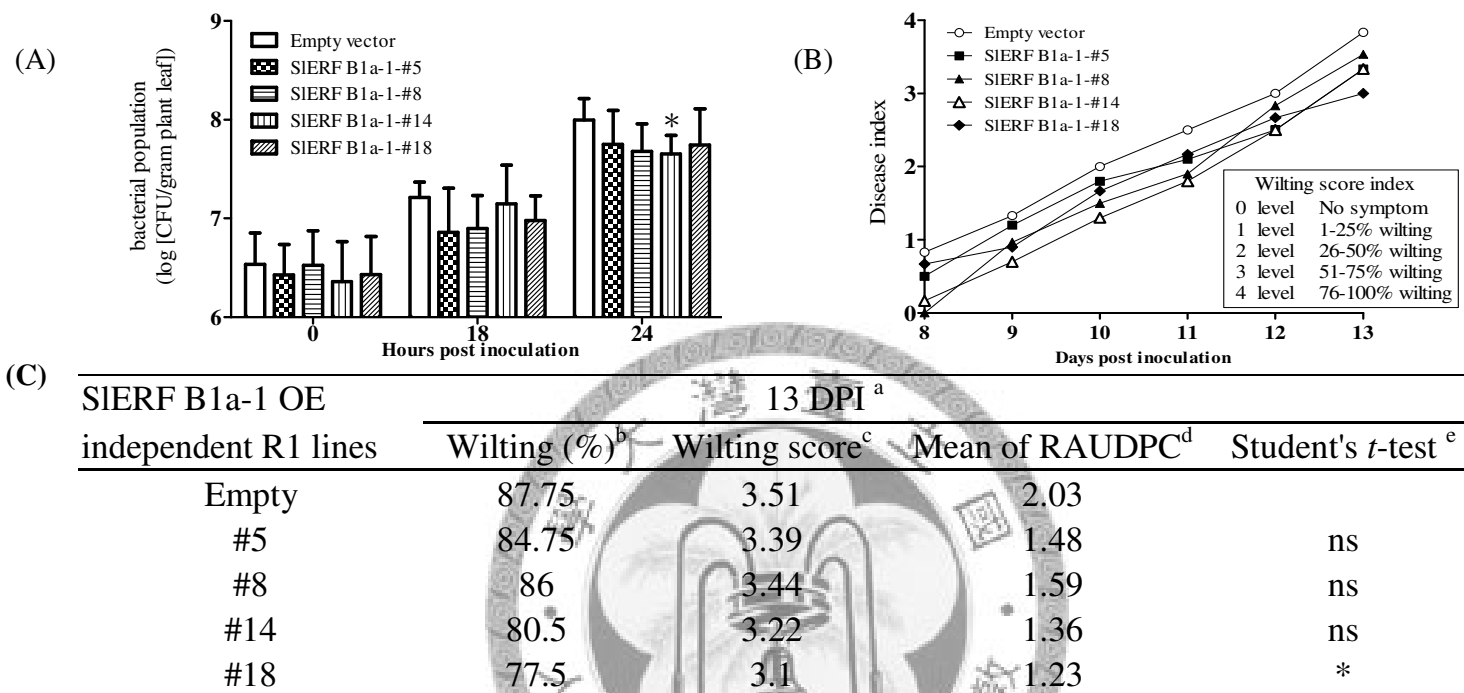
^d相對乾旱曲線下面積 (Relative area under the drought progress curve, RAUDPC)。

^e Student's *t*-test 統計分析，* 表示 *p*-value 小於 0.05。

圖十八、菸草 *35S::SIERF B1a-3* 成株對乾旱之耐受性測試。

(A,B) 利用四週大的菸草 *35S::SIERF B1a-3* 成株，進行乾旱缺水逆境的測試，逐日觀察停止給水後其外表型的乾萎變化並進行量化。

每次實驗有 15 株，共進行 2 重複，實驗結果趨勢一致，在此只呈現具代表性一次結果。



^a接種後天數 (Day post inoculation); ^b接種後平均之萎凋百分比; ^c接種後平均之萎凋指數;

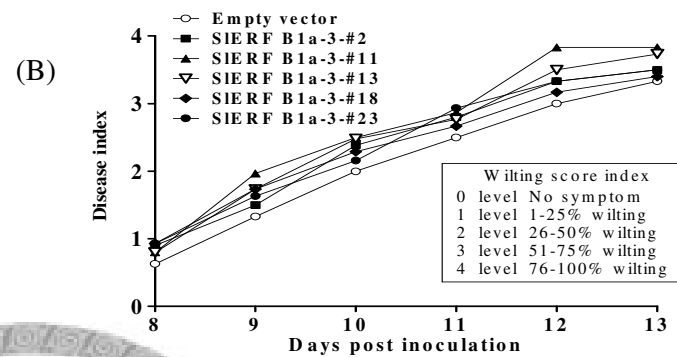
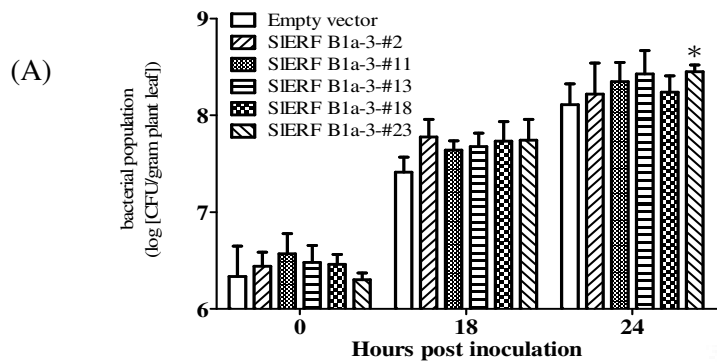
^d相對發病曲線下面積 (relative area under the disease progress curve); ^eStudent's *t*-test 進行統計, * 表示 *p*-value 小於 0.05。

圖十九、菸草 35S::SIERF B1a-1 成株對青枯病之抗性測試。

(A) 帶有空載體或番茄 *SIERF B1a-1* 之四周大轉殖植物經葉部 (detach leaf) 注射青枯病菌 ($OD_{600}=0.03$) 後, 病菌在葉中 0、18 及 24 個小時之增生情況與統計分析結果。

(B,C) 為帶有空載體或番茄 *SIERF B1a-1* 之四周大轉殖植物經過根部澆灌青枯病菌後之萎凋病程發展與統計分析結果。

每次實驗有 12 株, 共進行 2 重複, 實驗結果趨勢一致, 在此只呈現具代表性一次結果。



(C)

SIERF B1a-3 OE independent R1 line	13 DPI ^a			
	Wilting (%) ^b	Wilting score ^c	Mean of RAUDPC ^d	Student's <i>t</i> -test ^e
Empty vector	87.75	3.51	2.03	
#2	91.75	3.67	2.12	ns
#11	96	3.84	2.59	ns
#13	94	3.76	2.32	ns
#18	88.75	3.55	2.04	ns
#23	90.25	3.61	2.09	ns

^a接種後天數 (Day post inoculation) ; ^b接種後平均之萎凋百分比 ; ^c接種後平均之萎凋指數 ;

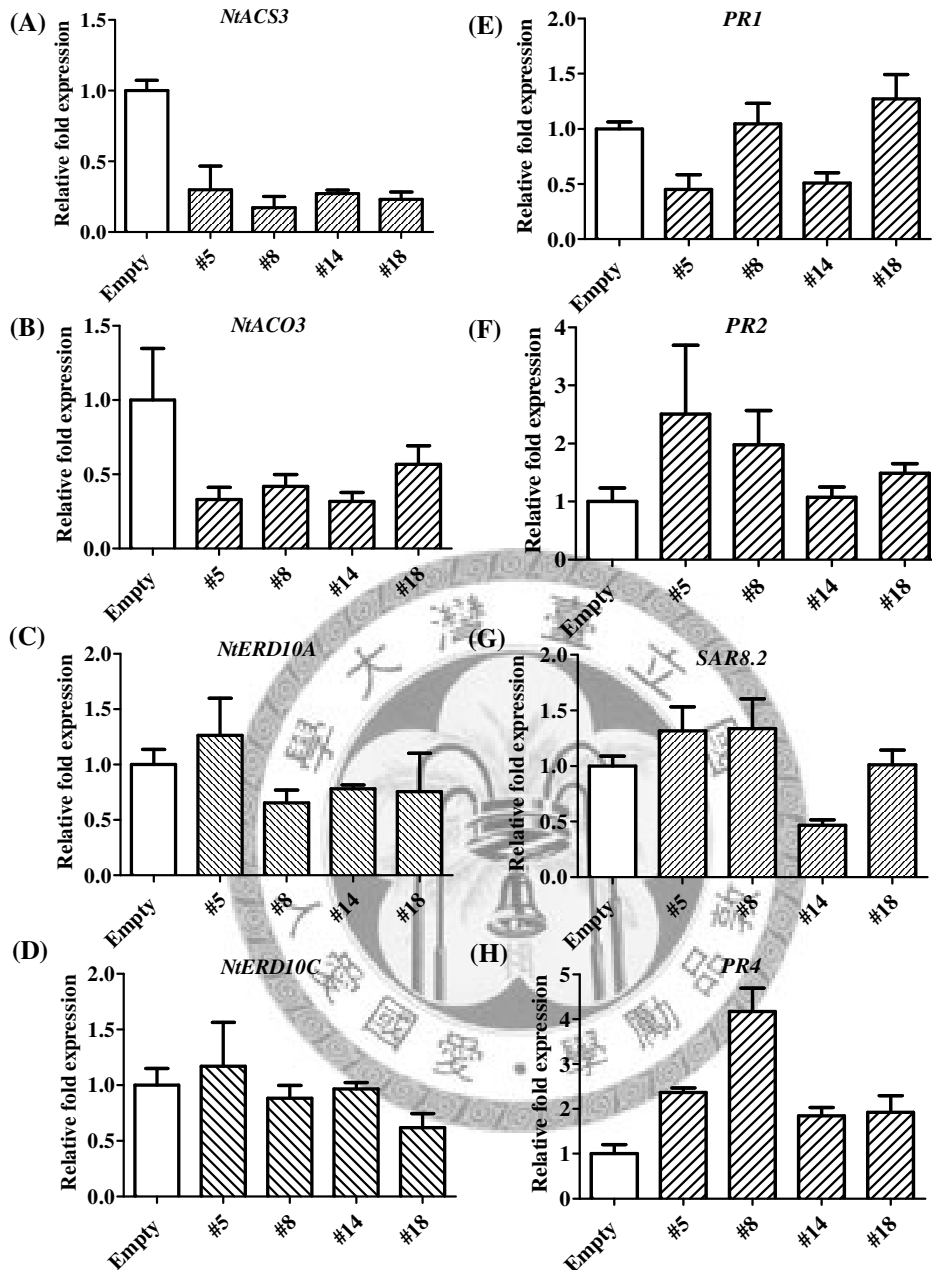
^d相對發病曲線下面積 (relative area under the disease progress curve) ; ^e Student's *t*-test 進行統計, * 表示 *p*-value 小於 0.05。

圖二十、菸草 35S::*SIERF B1a-3* 成株對青枯病之抗性測試。

(A) 帶有空載體或番茄 *SIERF B1a-3* 之四周大轉殖植物經葉部 (detach leaf) 注射青枯病菌 ($OD_{600}=0.03$) 後, 病菌在葉中 0、18 及 24 個小時之增生情況與統計分析結果。

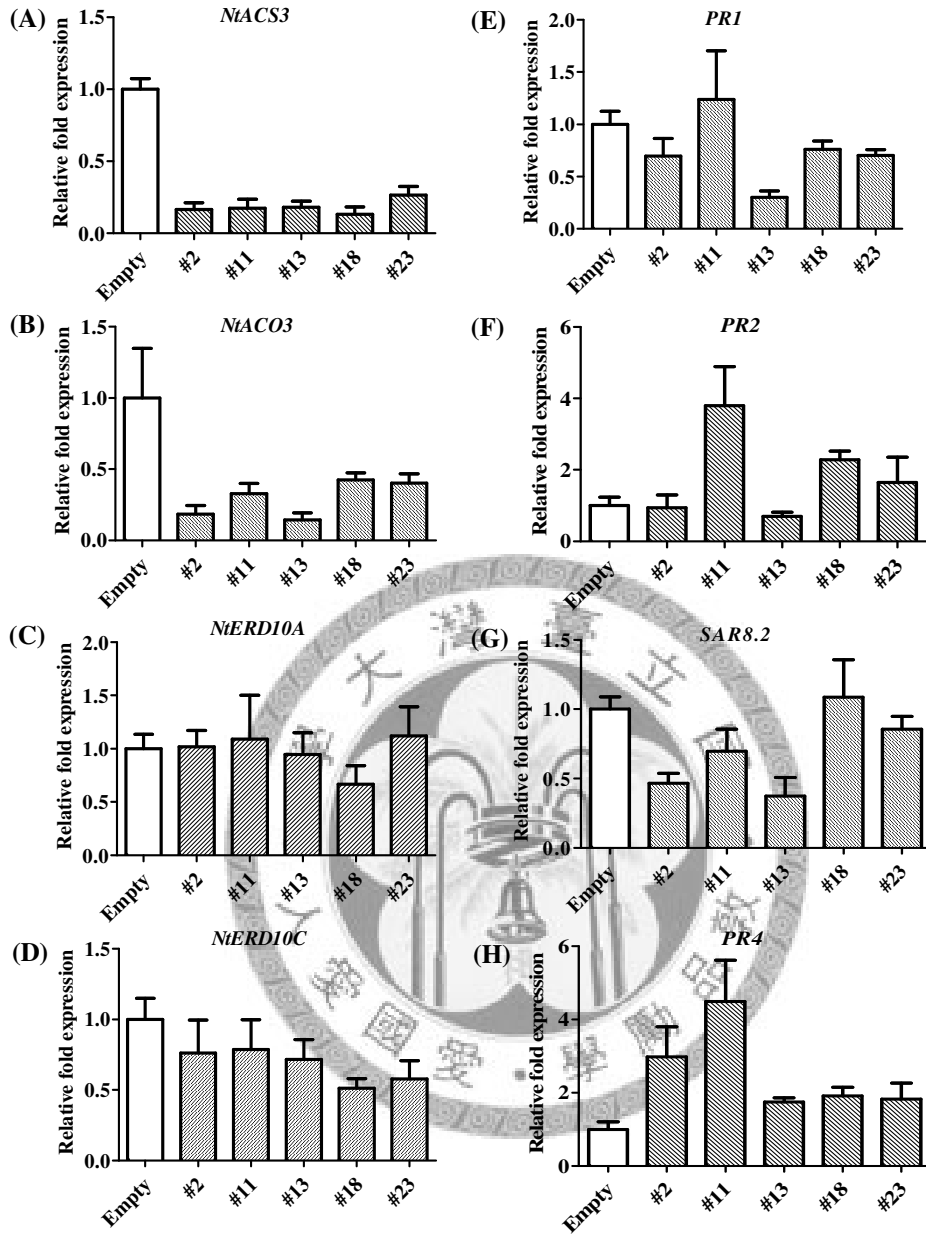
(B,C) 為帶有空載體或番茄 *SIERF B1a-3* 之四周大轉殖植物經過根部澆灌青枯病菌後之萎凋病程發展與統計分析結果。

每次實驗有 12 株, 共進行 2 重複, 實驗結果趨勢一致, 在此只呈現具代表性一次結果。



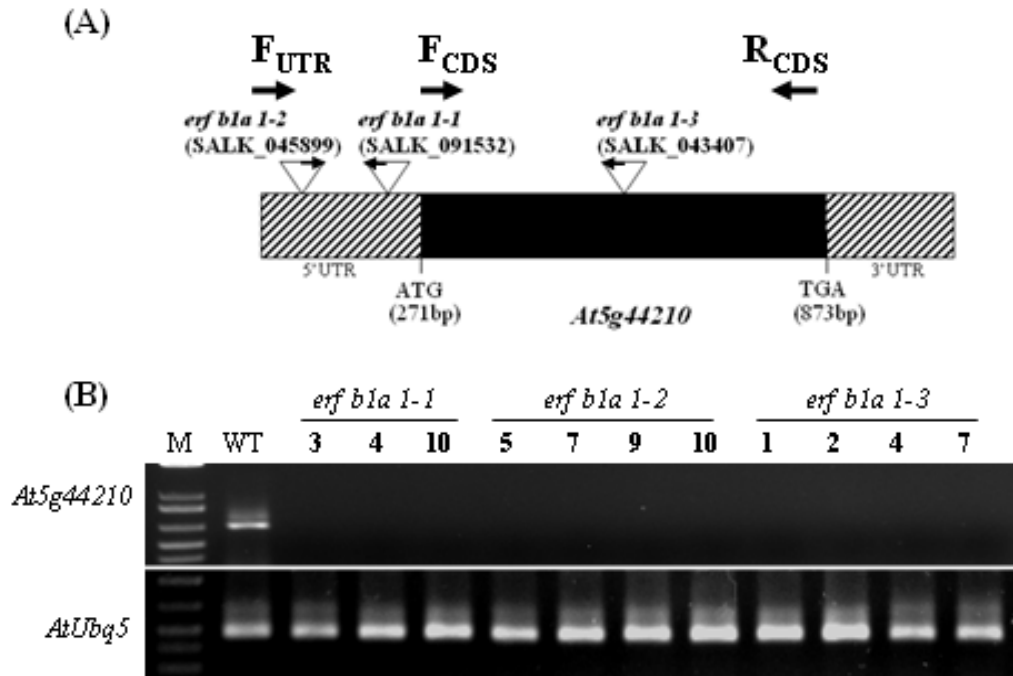
圖二十一、菸草 35S::SIERF B1a-1 中逆境反應相關標誌基因之表現。

將四周大 35S::SIERF B1a-1 轉殖菸草葉部之 RNA，以 RT-qPCR 進行基因檢測，(A,B) 乙烯合成相關標誌基因，(C,D) 乾旱相關標誌基因，(E,F,G,H) 病原相關標誌基因。Y 軸表示基因的相對表現量，X 軸表示各個獨立轉植株。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.)。



圖二十二、菸草 35S::SIERF B1a-3 中逆境反應相關標誌基因之表現。

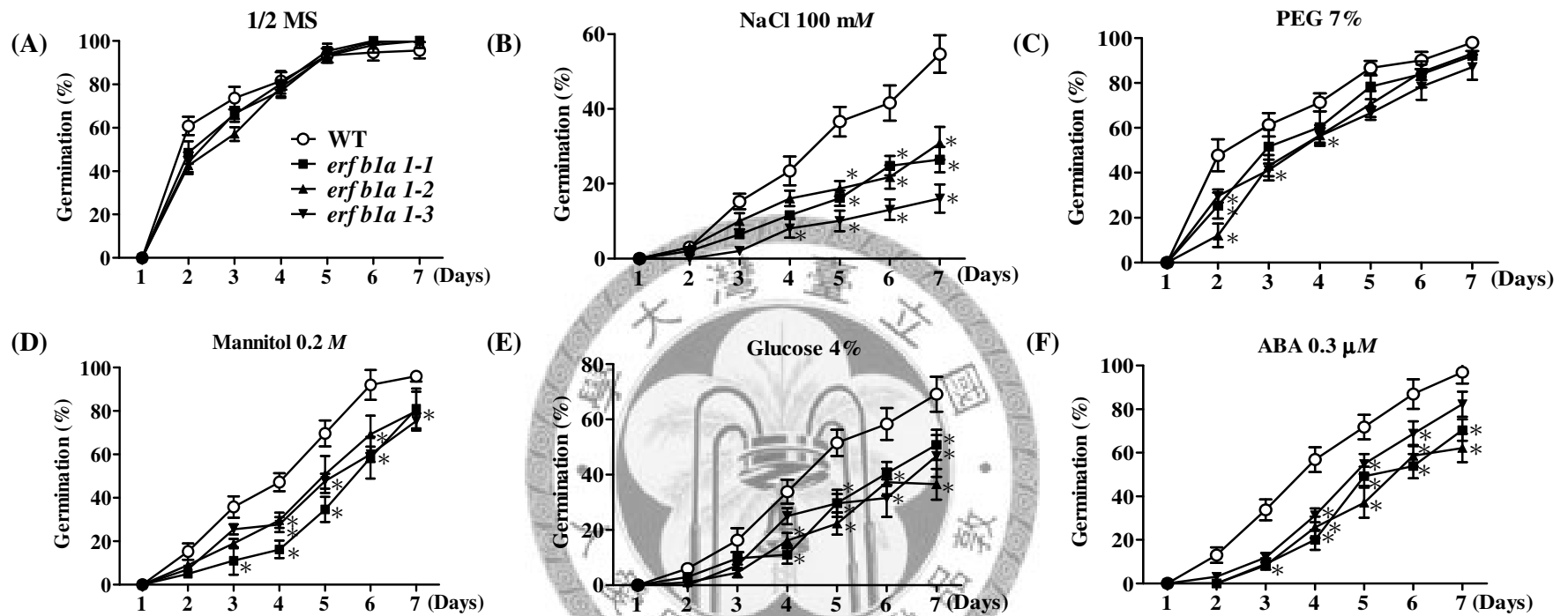
將四周大 35S::SIERF B1a-3 轉殖菸草葉部之 RNA，以 RT-qPCR 進行基因檢測，(A,B) 乙烯合成相關標誌基因，(C,D) 乾旱相關標誌基因，(E,F,G,H) 病原相關標誌基因。Y 軸表示基因的相對表現量，X 軸表示各個獨立轉殖株。本實驗重複 2 次且趨勢一致，在此只呈現具代表性的一次結果。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。



圖二十三、*At5g44210* 之 T-DNA 嵌入突變體的分子檢測。

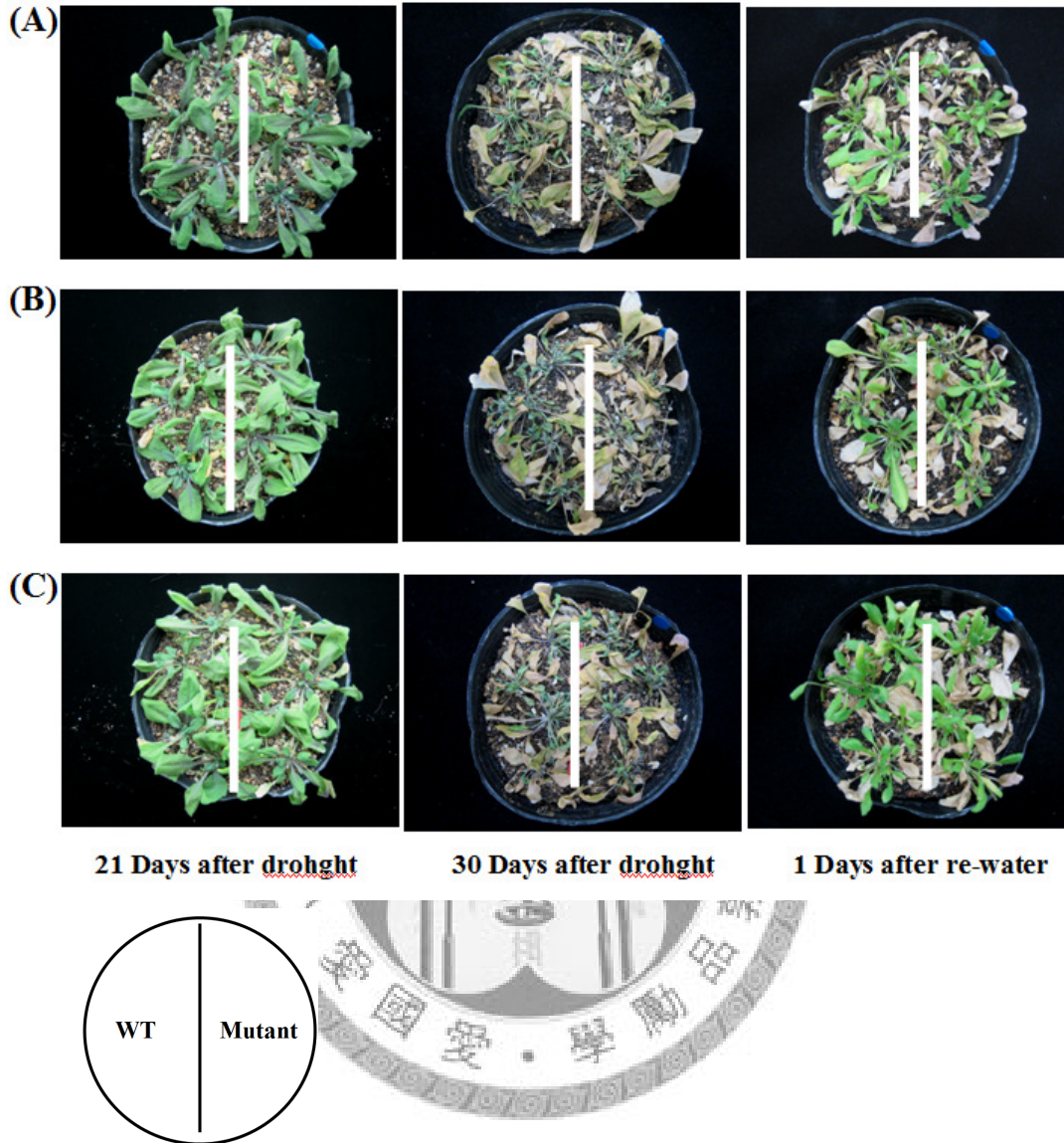
(A) *At5g44210* 基因的結構圖示。斜線方塊代表 UTR (untranslational region) ，黑色方塊代表 exon。該基因有被 T-DNA 插入三個不同位置的突變體 (倒三角形表示 T-DNA 插入位置)。設計 gDNA 進行 PCR 的四種引子分別為 F_{CDS} 、 R_{CDS} 、 F_{UTR} 與 T。

(B) 利用半定量 RT-PCR 分析不同的 mutant line 其 *At5g44210* 基因的表現量，M 表示 DNA marker，WT 表示 Col-0 的植株。



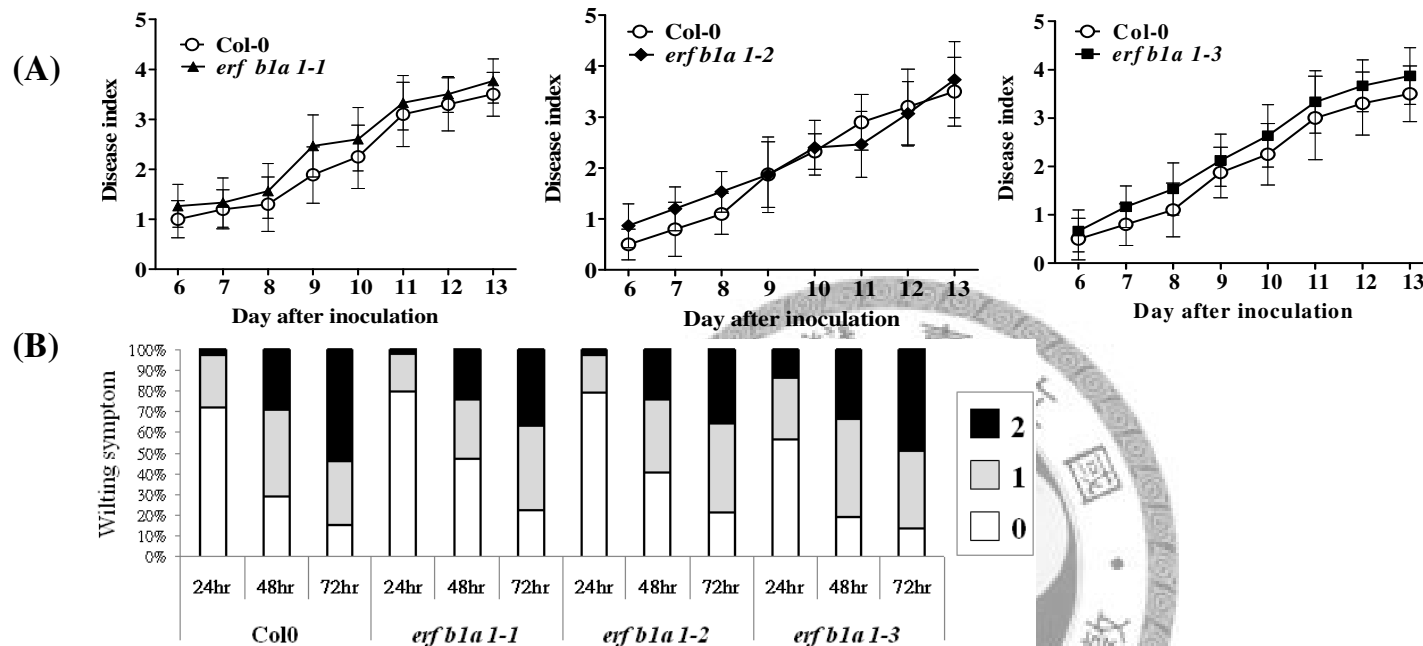
圖二十四、*At5g44210* 剔除株於非生物逆境下之種子萌發測試。

將經春化作用後打破休眠的種子，播種於含有不同濃度的非生物逆境，比較 Col-0 與突變體在種子發芽期間的情形。每次實驗利用 3 盤（每盤中每個突變體各 50 顆種子）進行發芽測試，共進行 2 重複，結果趨勢一致，在此只呈現具代表性的一次結果，* 表示 Student's *t*-test 進行統計分析後其 *p*-value 小於 0.05。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。



圖二十五、*At5g44210* 剔除株之乾旱反應測試。

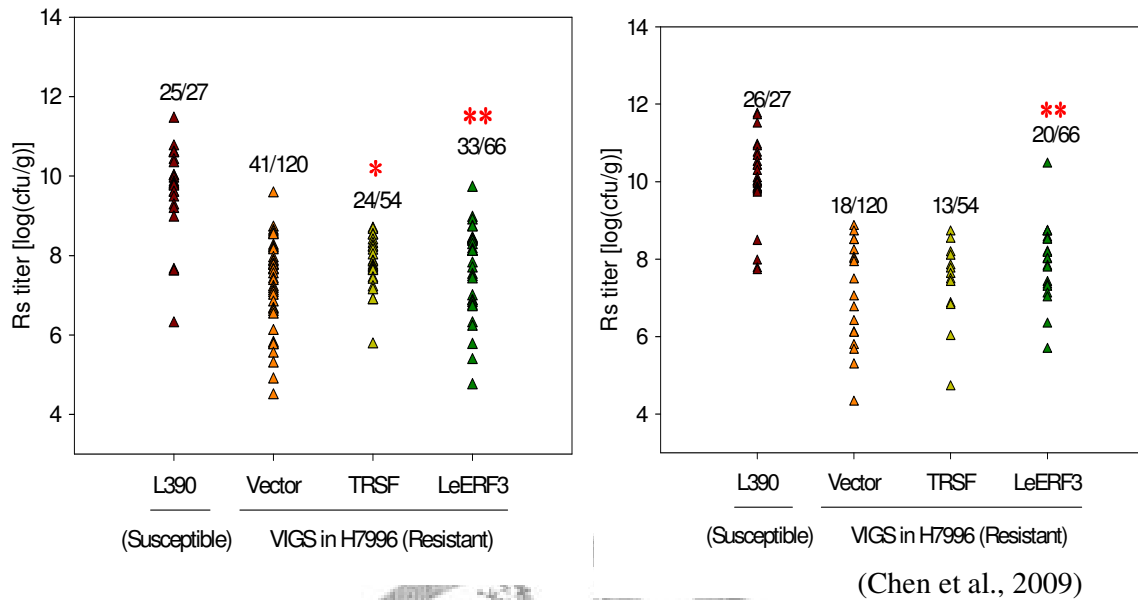
四周大 *erfbla 1-1* (A)、*erfbla 1-2* (B)、*erfbla 1-3* (C) 突變體進行乾旱處理第 21 天及第 30 天之生長情況，且於進行回水後第 31 天的恢復生長情形。每次實驗為 12 棵，共進行 2 次試驗，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性的一次結果。



圖二十六、*At5g44210* 剔除株之病害反應測試。

(A) 利用青枯病菌 Rd15 接種斷根植株後之病程發展，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，在此只呈現具代表性一次。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。

(B) 接種 necrotrophic 的細菌性軟腐病菌後之病程發展，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)。每次實驗利用 40 個葉片進行抗病性測試，總共進行 2 次，實驗結果趨勢一致，在此只呈現具代表性一次。



附錄一、*SIERF3* (*LeERF3*) 基因在抗病品系 H7996 進行 VIGS 檢測植物體內細菌增生的情形。



















































左圖：在番茄莖基部檢測菌量；右圖：在番茄莖部檢測菌量

以 student's *t*-test 比較空載體(Vector)與 VIGS 靜默 *SIERF3* 基因的植株。

ns 為空載體與 *SIERF3* 無明顯差異(not significant, $P > 0.05$)，

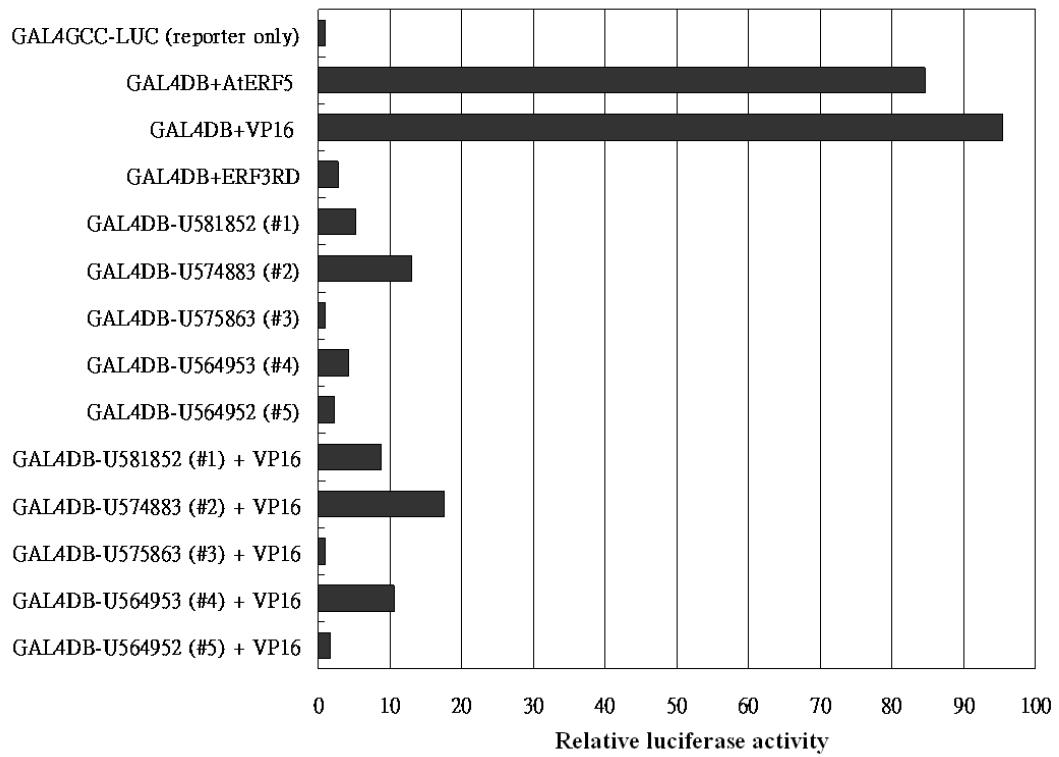
*為空載體與 *SIERF3* 有顯著差異(significant, $0.01 < P < 0.05$)，

**為空載體與 *SIERF3* 有高度顯著差異(highly significant, $P < 0.01$)。

Normalized Fold Expression Up-regulated Control Down-regulated	Tissue (BW ^R)	Phytohormones (BW ^R)				Biotic stress					Drought stress	
		0, 1, 2, 4, 8, 24 (hr)				<i>Rs</i>		<i>Rs hrpG</i>	<i>Rs</i> Lysate	Flg22	Dry Re Re	
	Abundant	ET	JA	SA	ABA	0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 (hr)		0, 0.5, 1, 2, 4 (hr)			2, 6, 12, 24, 48 (day) (hr)	
						BW ^R	BW ^S	BW ^R	BW ^R	BW ^R	(BW ^R , collar)	
												
				=			=				=	
						=						
							=				=	
												

附錄二、綜合 *SIERF Bla* 基因群在組織與遭受青枯病及非生物逆境時之表現。

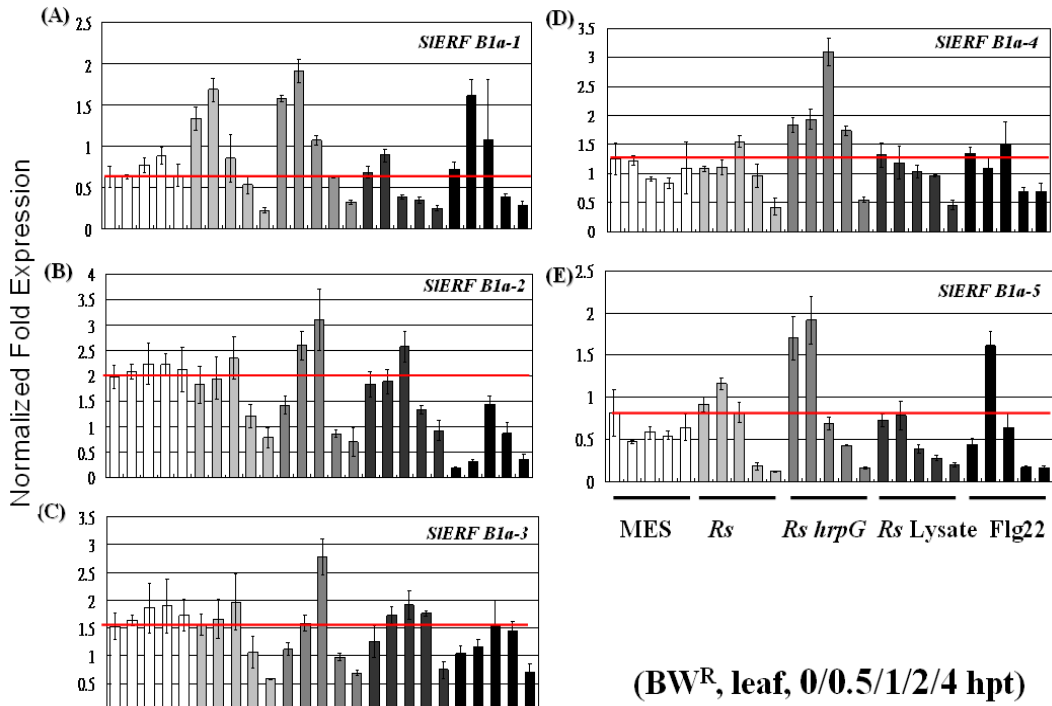
紅色曲線：基因在不同時間表現上升趨勢，綠色曲線：基因在不同時間表現下降趨勢，等號 (=) 代表基因沒有顯著受到調控。



附錄三、*SIERF B1a* 基因群進行轉錄活性之分析。

僅一次的實驗結果。



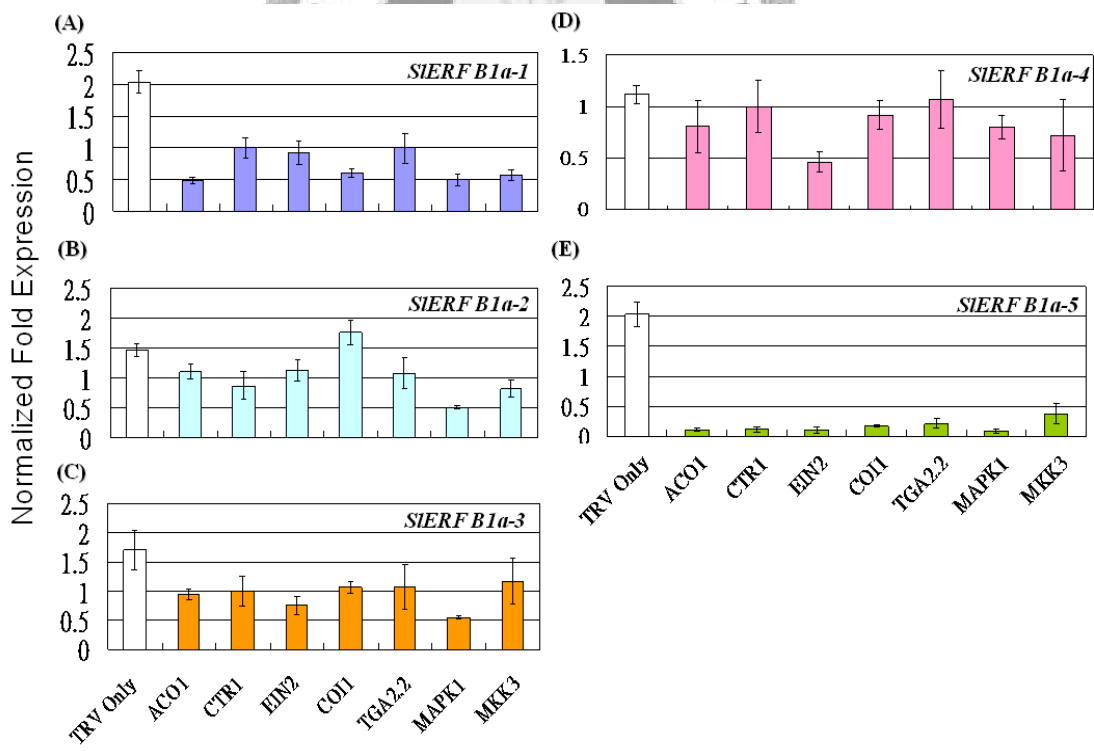
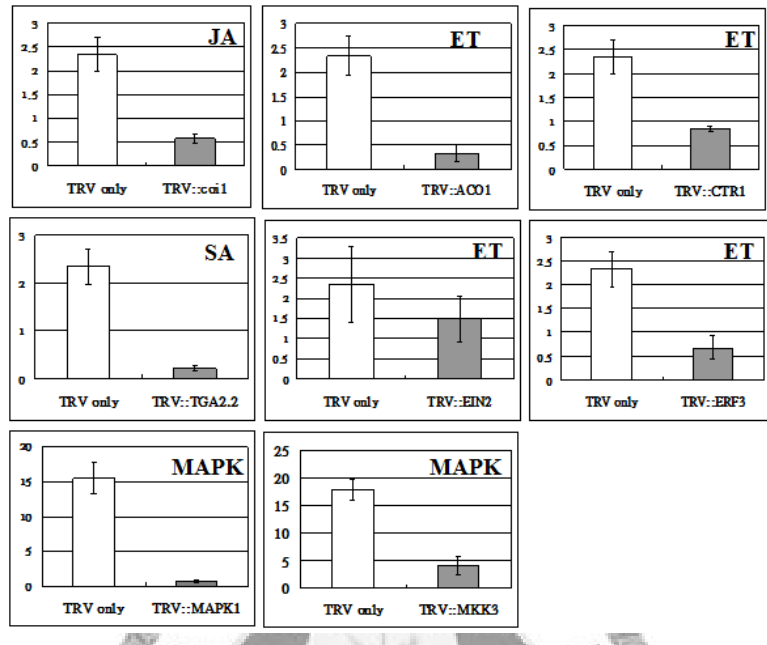


附錄四、番茄經細菌相關 PAMPs 處理後其 *SIERF B1a* 基因群的表現。

三周大番茄植株進行四種 PAMPs 處理，濃度如下：

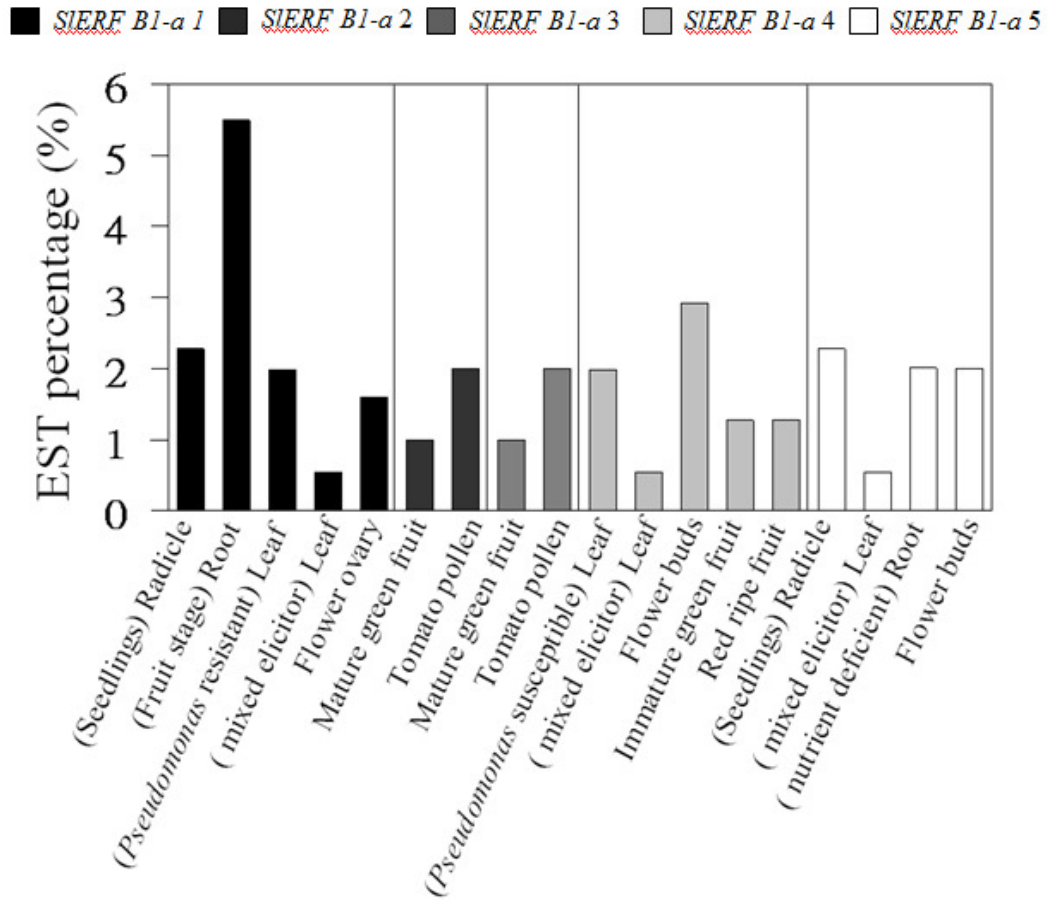
- (1) 青枯病菌 $OD_{600}=0.03$ (1×10^6 CFU/mL) 作為活菌對照組。
- (2) 第三型分泌系統缺失的突變體 (TTSS defective *hrpG* mutant) $OD_{600}=0.03$ 。
- (3) 青枯病菌死細胞溶解物 (*Rs* lysate) 懸浮於含 10mM MES 懸浮液。
- (4) 細菌鞭毛蛋白 Flg22 (含有保守性 22 個氨基酸殘基的鞭毛蛋白質)。
- (5) 對照組為 10 mM MES 之緩衝液。

處理的方式為將番茄植物將第三、四、五片真葉的五片小葉先以 $2 \mu\text{L}$ 的微量吸管戳洞，再利用針筒注射葉片，使葉片注滿 PAMPs 的溶液，收取針筒注射後第 0、0.5、1、2、4 小時後之番茄第三、四、五片真葉的組織，進一步檢測 *SIERF B1a* 基因表現。僅一次的實驗結果。



附錄五、檢測番茄防禦路徑相關基因靜默後其 *SIERF B1a* 基因群之表現情形。

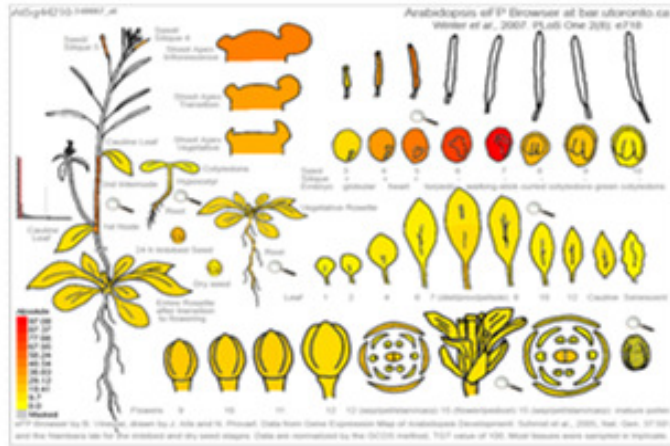
僅一次的實驗結果。



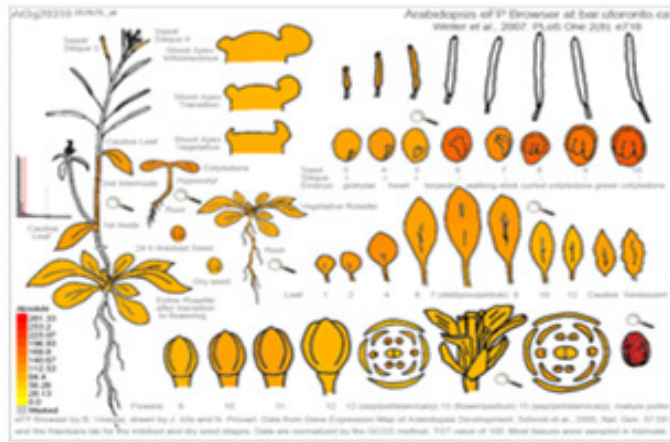
附錄六、搜尋番茄 EST 資料庫 SIERF B1a 基因群在不同組織中之表現情形。



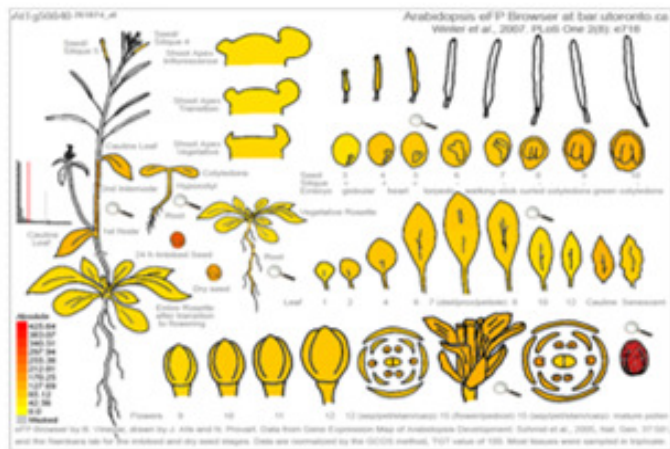
At5g44210



At3g20310

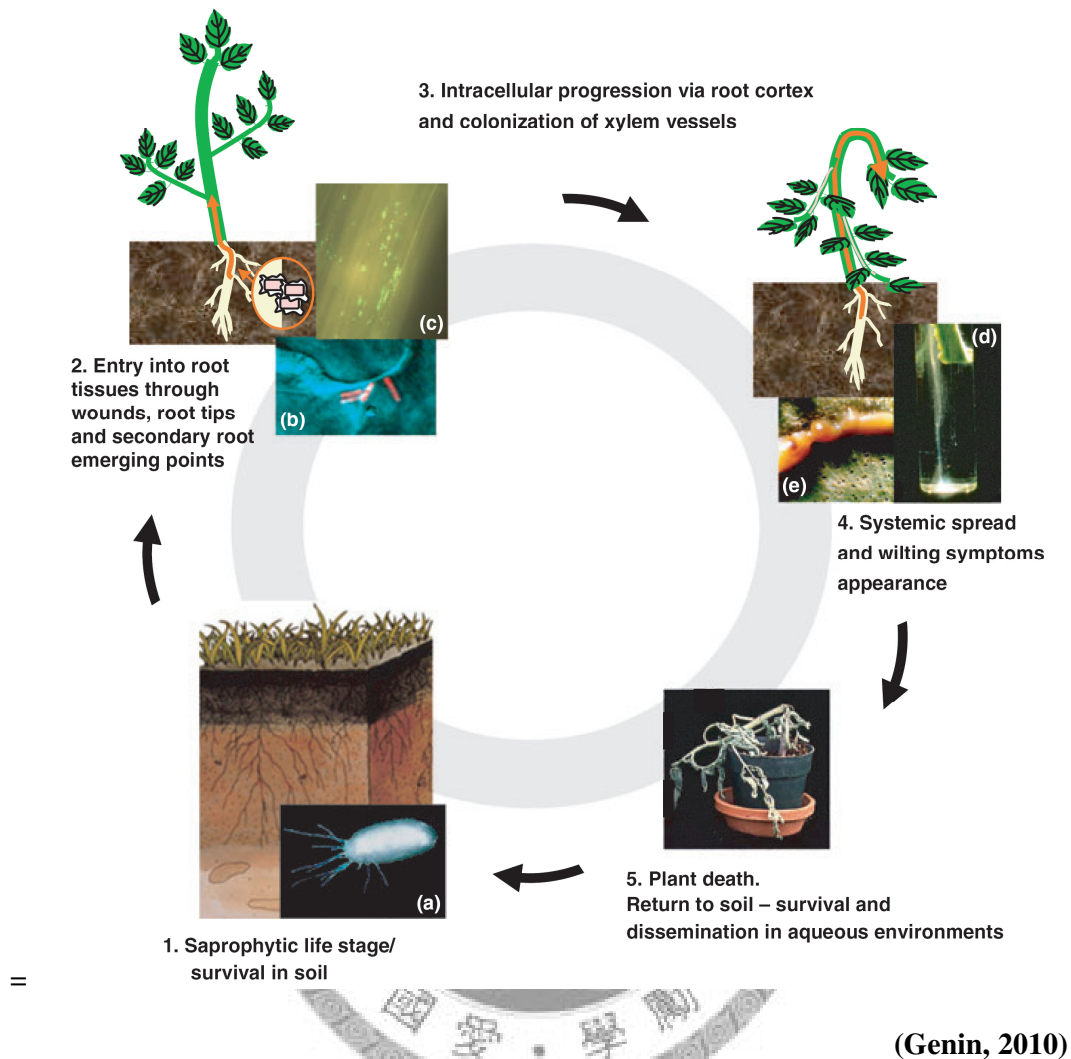


At1g50640



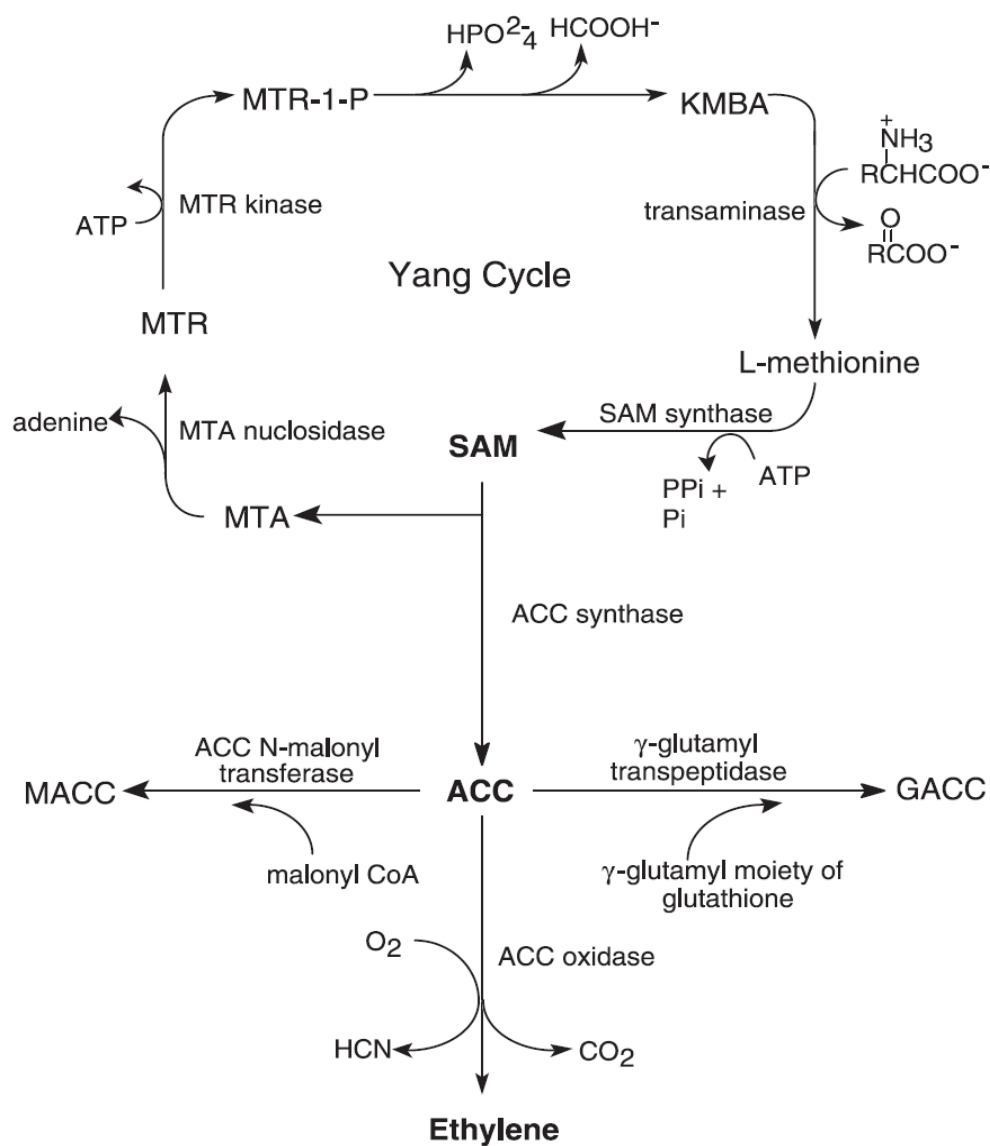
附錄七、搜尋番茄 *SIERF B1a* 基因群在阿拉伯芥之 ortholog 基因的組織表現情形。

藉由 Salk Institute Genomic Analysis Laboratory) 網站 (<http://signal.salk.edu/>) 之 Arabidopsis eFP Browser 進行分析。



附錄八、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 感染植物的過程。

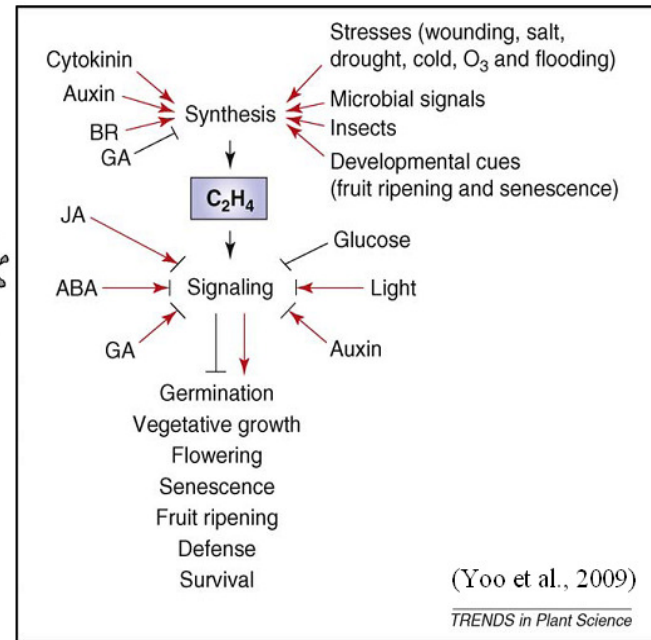
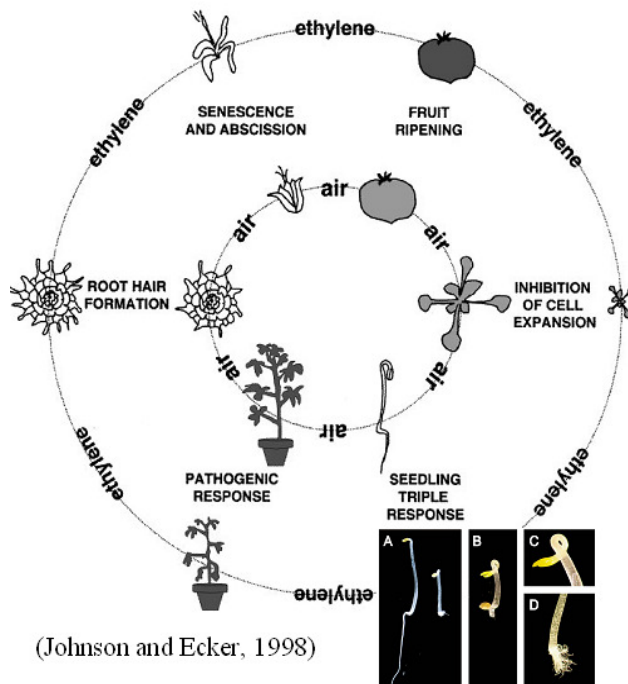
病原菌通常存在耕地土壤中，病菌經由泳動性趨向宿主植物根部的組織如根尖或側根突出點進入植物的維管束組織並進行感染，並且會在木質部導管大量增生並且產生豐富具黏性的胞外多醣體，阻塞維管束的水份運輸造成萎凋，植物萎凋死亡後其組織中的病菌又會被釋放到土壤中等待時機進行感染，遭受感染的植物其致死率極高。又因植株快速萎凋枯萎時外表呈青綠色，故得名「青枯病」，但目前為止卻無任何有效的化學防治方式，造成嚴重的農業減產及經濟損失。



(Stearns and Glick, 2003)

附錄九、乙烯生合成的途徑。

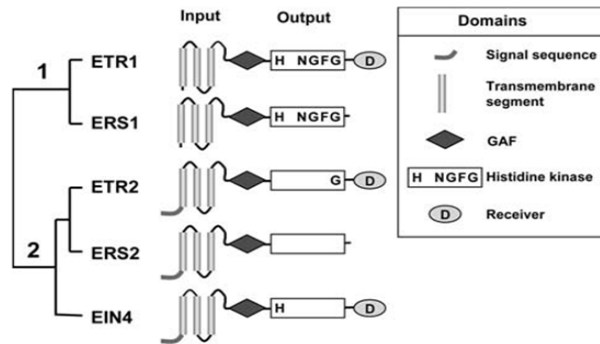
植物所生合成的乙烯，是由楊祥發博士研究出乙烯生合成的途徑稱之為 the Yang cycle 生成的，生合成一開始 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM) 被 ACC 合成酶 (ACC synthase, ACS) 催化，形成乙烯的前驅物氨基環丙烷羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)，ACC 可以進一步被 ACC 氧化酶 (ACC oxidase, ACO) 催化形成乙烯、CO₂ 和 HCN。



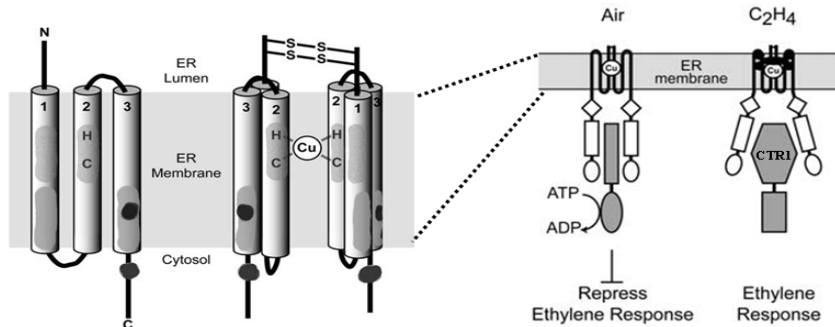
(Schaller1 and Kieberb, 2002)

附錄十、乙烯對植物的影響與其調控網絡。

乙烯於種子萌發時可引起下胚軸的膨脹變粗，使得幼苗易伸出土面，乙烯對植物莖的延長有抑制作用，可以使植物莖桿增粗以抵抗物理傷害，還可以抵抗病菌對植物的侵染。另外，乙烯亦是引發果實後熟很重要的植物荷爾蒙，能加速葉、花和果實的老化與生理變化，但乙烯最重要的生物反應還是在黑暗環境中三重反應 (triple response)：即下胚軸膨脹變短，根部縮短以及頂芽彎鉤狀加劇的現象，乙烯之調控網絡與生長素、光、吉貝素、茉莉酸、水楊酸、細胞分裂素、葡糖糖等途徑存在著廣泛的交互反應，共同參與了調控植物的生長發育和抵抗反應生物與非生物逆境 (Johnson and Ecker, 1998；Schaller1 and Kieberb, 2002；Yoo et al., 2009)。



The ethylene receptor family of *Arabidopsis*.

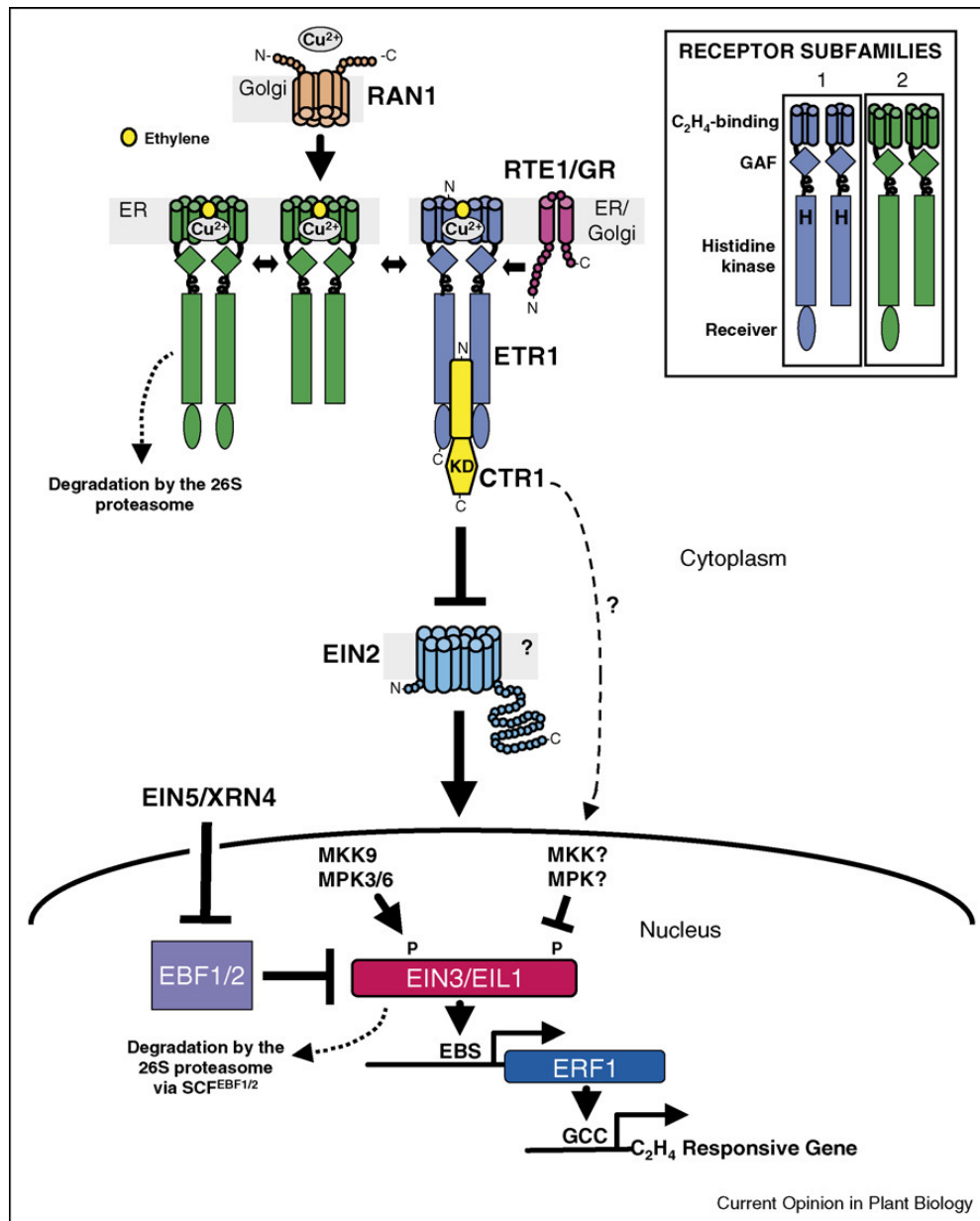


Model of ethylene binding site. Model for signaling by ethylene receptors.

附錄十一、乙烯受器基因家族之介紹。

(Hall et al., 2007)

乙烯受器共有五種並且分成兩個次家族，分別為 ETR1 (ETHYLENE RESPONSE1) 與 ERS1 (ETHYLENE SENSOR1) 屬第一群，ETR2 (ETHYLENE RESPONSE2)、EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE4) 與 ERS2 (ETHYLENE SENSOR2) 屬第二群。基本上乙烯受器的組成分為輸入 (input) 與輸出 (output) 兩大部份，分別具備以下結構：在輸入部分有穿膜蛋白與 GAF domain，穿膜蛋白是由三個編號 1、2、3 的跨膜蛋白小單元組成 monomer，而於其第 2 號跨膜蛋白之 N 端 domain 中的第 65 個胺基酸 Cys65 與第 69 個胺基酸 His69 可與位於高基氏體胞膜上 P-type ATPase 銅轉運者 RAN1 所運送的銅離子 (Cu^{2+}) 進行螯合，形成 hydrophobic pocket 的構型，進一步協助與乙烯氣體的結合。輸出部分是由組胺酸激酶 (histidine kinase)、調節蛋白之 receiver domains 與訊號序列 (signal sequences) 所組成，組胺酸激酶方面：其在胺基酸 C 端具有保守性一級結構 NGFG motif，能夠自行產生磷酸化作用；在調節蛋白方面：其 receiver domains 主要功能是藉由天門冬胺酸 (aspartate) 進行傳遞磷酸化訊息至下游的基因。



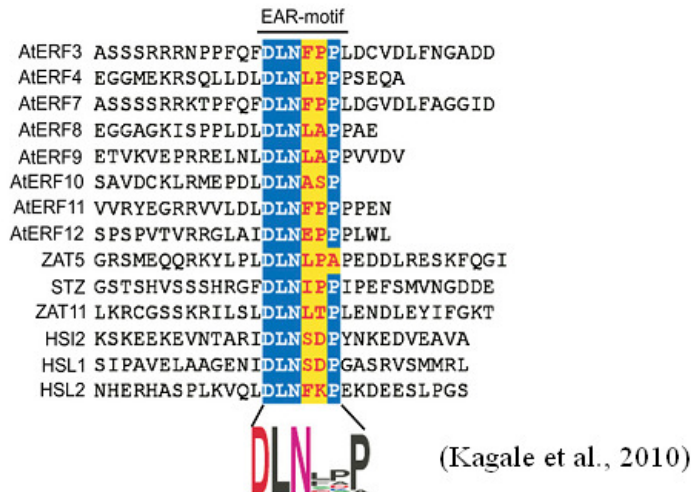
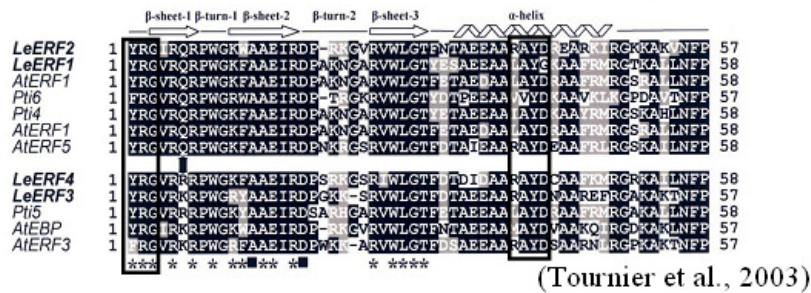
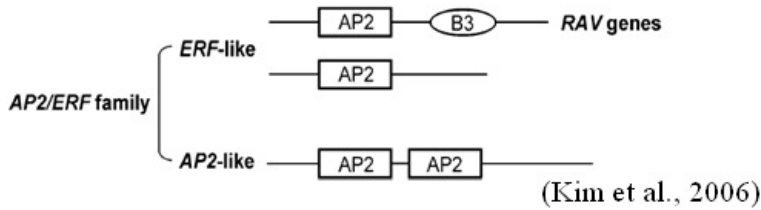
(Kendrick and Chang, 2008)

附錄十二、乙烯訊息傳遞途徑。

金屬銅離子參與乙烯受器複合蛋白的生合成與轉運之機制，乙烯的受器蛋白原位於高基氏體 (golgi) 胞膜上。首先，藉由金屬轉運蛋白 COPT1 (copper transporter1) 將銅離子通過細胞質膜運送進入細胞質內，接著由細胞質內的銅轉運子 CCH，將銅離子運送到高基氏體，再經由高基氏體胞膜上的 RAN1 蛋白，將

銅離子轉運至高基氏體內，當高基氏體內的銅離子濃度累積到一定程度時，銅離子就會與位於高基氏體胞膜上之乙烯受器蛋白結合，成為成熟的乙烯受器複合體。

正常情況之下，受器 input 部分形成 hydrophobic pocket 的構型呈現打開形式，output 部分組胺酸激酶區域會與負調控因子 Raf-like kinase 的 CTR1 蛋白 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1) 結合形成複合體 (receptor-CTR1 complex)，此時 CTR1 蛋白為活化的形式，抑制訊息傳遞往下游傳導。乙烯存在情況之下，乙烯分子會與受器結合，此時使原本 receptor-CTR1 複合體的構型改變，CTR1 蛋白的 kinase domain 會失去活化，蛋白被送往 26S proteasome 蛋白酶體降解，使原本被抑制的訊息傳遞可以往下游進行傳遞，此時 EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE2) 與 EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE4) 會大量累積，調控 EIN3 與 EIL1 (EIN3-LIKE1)，而其亦扮演第一次轉錄調控的角色，在正常情況下，藉由兩個 F-box 蛋白分別為 EBF1 (EIN3-binding F-box 1) 與 EBF2 (EIN3-binding F-box 2) 與 Skp-Cullin-F-box E3 ligase 形成複合體，進一步結合 EIN3 與 EIL1，並將此蛋白傳送至 26S proteasome 進行蛋白降解，如果植物是直接經由 CTR1-dependent 磷酸化的途徑，會加強 EBF1 與 EBF2 結合 EIN3 與 EIL1，進行蛋白降解並且抑制乙烯訊息傳遞。而 EIN3 與 EIL 轉錄因子的穩定程度，是藉由 MKK9-MPK3/6 cascade 專一性的磷酸化 EIN3 的 Thr 胺基酸，使之具有轉錄活性。在乙烯存在的時候，EIN5 為一個 5 端至 3 端作用的 exoribonuclease 酵素會增進 EBF1 與 EBF2 的 mRNA 被降解掉，使之無法順利轉譯具功能性蛋白，而 EIN3 與 EIL1 轉錄因子會被 MKK9-MPK3/6 cascade 活化，並在細胞核內穩定且大量累積，開始進行乙烯調控細胞內的第一次轉錄作用，EIN3 與 EIL1 會進一步去結合乙烯轉錄因子 ERF 基因啟動子上游的 EIN3-binding site (EBS)，接著啟動 ERF 轉錄因子的二次轉錄活化作用，結合一些對於乙烯反應相關基因上游的起動子，啟動與乙烯調控相關的保護與防禦基因 (Kendrick and Chang, 2008)。



附錄十三、AP2/ERF 基因家族之構造與 domain 結構及 EAR motif。

AP2/ERF 基因家族之構造：一、ERF-like 基因包含一個 AP2 domain；二、AP2-like (APETALA2-like) 基因包含二個 AP2 domain；三、RAV (Related to ABI3/VP1) 基因除了包含一個 AP2 domain 及另一與 DNA-binding 的 B3 domain。

AP2/ERF domain 主要的二級結構，由三個 β -sheet 及一個 α -helix 所組成，其 domain 中兩個高度保守性的胺基酸區域，分別為 YRG 區域及 RAYD 區域。YRG 區域的胺基酸成員有 20 個，主要以 Tyrosine (Y)、Arginine (R)、Glycine (G) 為主；RAYD 區域主要以 Arginine (R)、Alanine (A)、Tyrosine (Y)、Aspartic acid (D)。

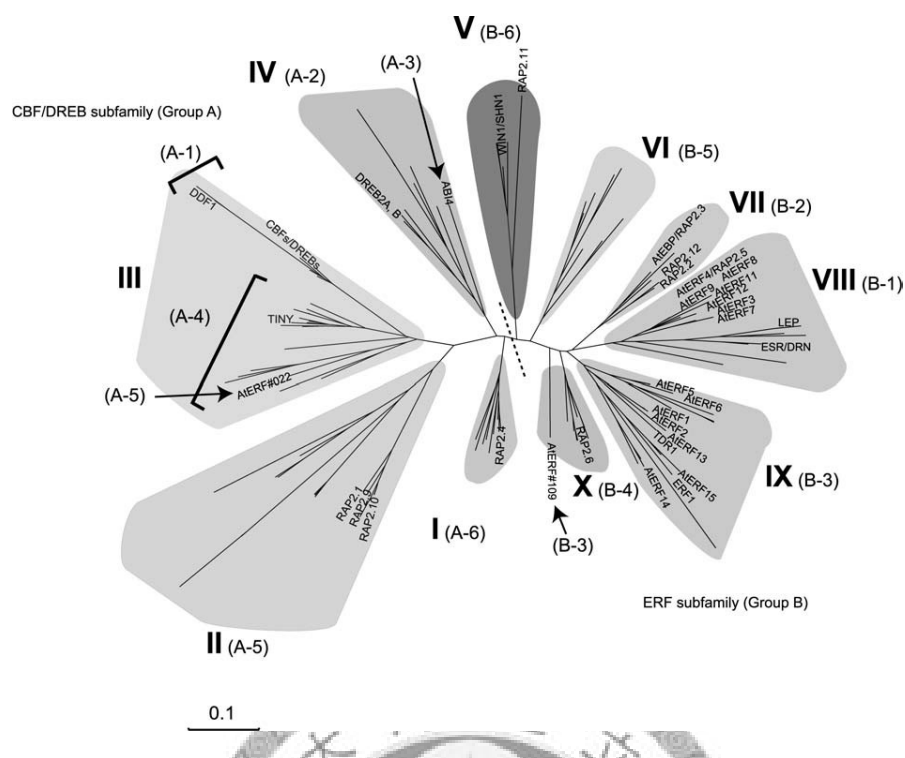


Table 1. Summary of the AP2/ERF superfamily

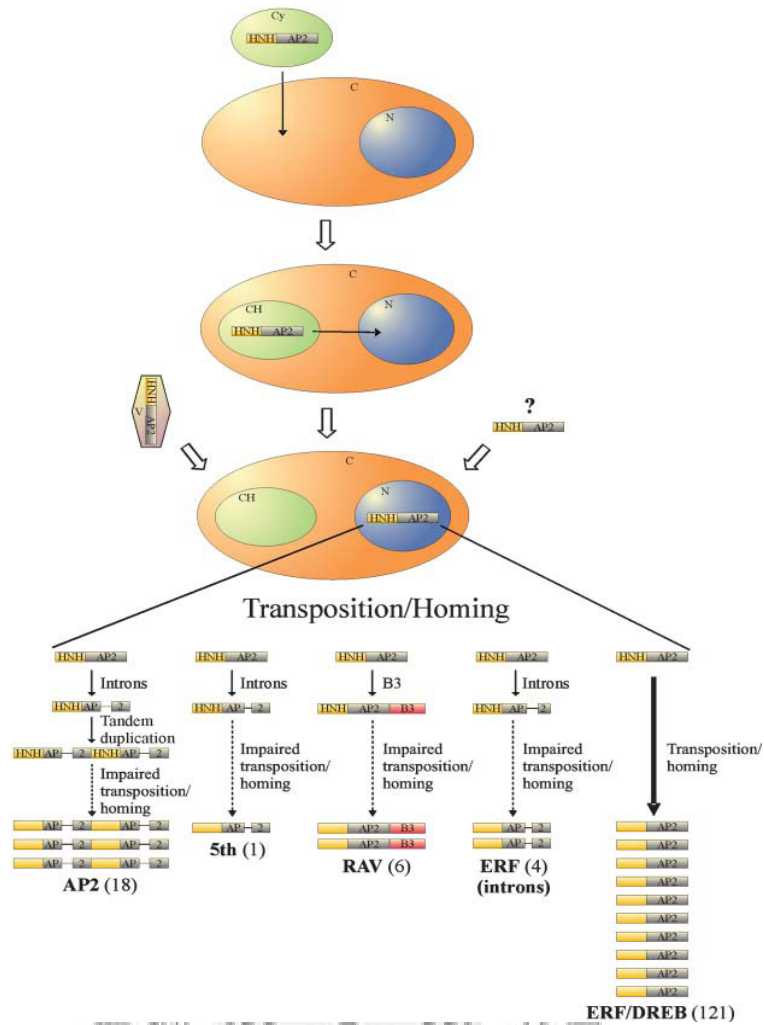
Total for each family is shown in bold.

Classification	This Study		Sakuma et al. (2002)		
	Group	No.	Classification	Subgroup	No.
AP2 family		18	AP2 subfamily		17
	Double AP2/ERF domain	14		Double AP2/ERF domain	14
	Single AP2/ERF domain	4		Single AP2/ERF domain	3
ERF family		122	DREB, ERF subfamily		121
	Groups I to IV	57	DREB subfamily	A-1 to 6	56
	Groups V to X	58	ERF subfamily	B-1 to 6	65
	Groups VI-L and Xb-L	7		B-6	
At4g13040		1	AL079349		1
RAV family		6	RAV subfamily		6
Total		147	Total		145

(Nakano et al., 2006)

附錄十四、阿拉伯芥 AP2/ERF 超級家族之親緣關係。

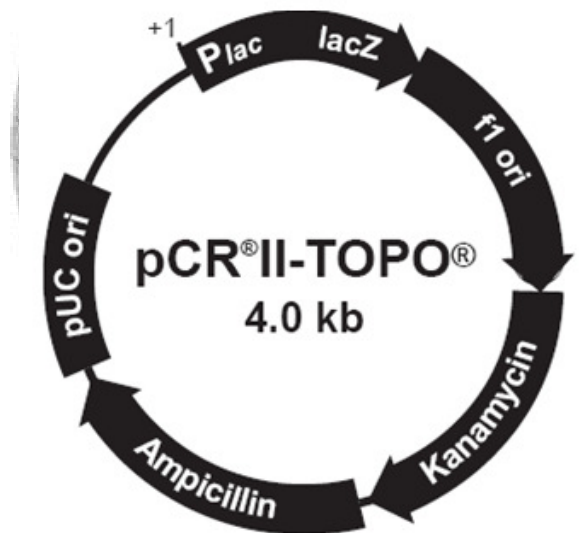
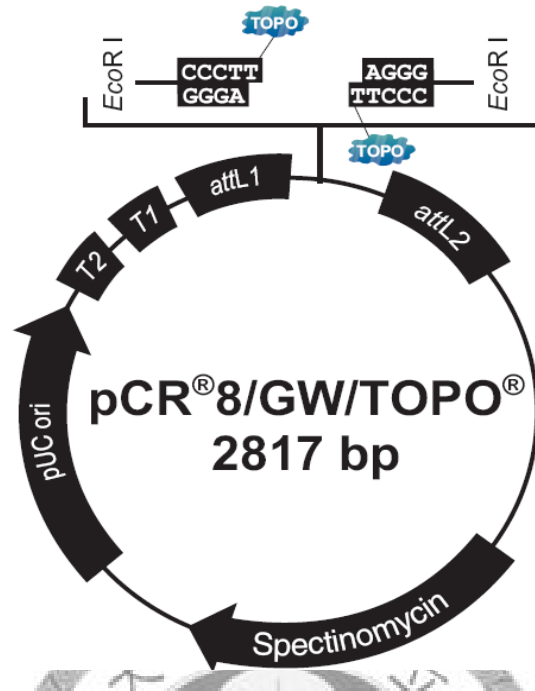
- 一、分別為具有兩個 AP2/ERF domain 的 AP2 次家族總共 18 個。
- 二、具有一個 AP2/ERF domain 的 DREB/ERF 次家族總共 122 個成員，其中 DREB 家族細分成群組 I 至 IV 四個小組總共 57 個成員，ERF 家族分成 V、VI、VII、VIII (B1-a)、IX 與 X 共 58 個以及 VI-L 與 Xb-L 共 7 個，所以 ERF 家族本身所分類的七個小群組共有 65 個成員。
- 三、具有一個 AP2/ERF domain 及一個 B3 domain 的 RAV 次家族總共 6 個。
- 四、At4g13040 基因。



(Magnani et al., 2004)

附錄十五、AP2/ERF domain 在植物中之演化過程。

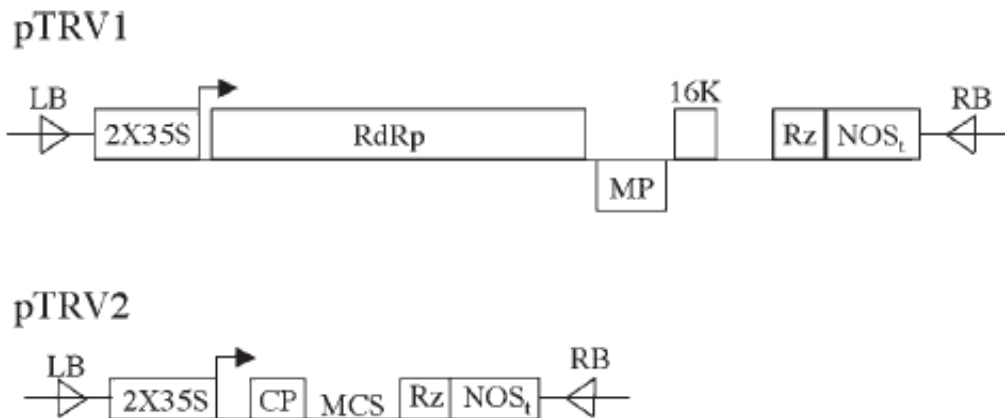
研究發現 AP2/ERF domain 之同源性蛋白，存在藍綠藻、鞭毛原生物之四膜蟲 (*Tetrahymena thermophila*)、噬菌體這些非植物的基因組內，作者也發現不管在植物以及非植物的體內都發現在 AP2 domain 前伴隨一個 HNH domain 的存在形成 HNH-AP2 的形式，推論 AP2 domain 的轉移經由病毒以及細菌感染植物，誘導 HNH-AP2 endonuclease 內切酶活化，經水平基因轉移將 AP2 domain 鑲嵌入植物的基因組。圖表縮寫：Plants (C)、cyanobacterium (Cy)、chloroplast (Ch)、nucleus (N)、viruses (V)。



附錄十六、用於 TA cloning 的 pCR8[®]/GW/TOPO[®] 與 pCR[®]II-TOPO[®]載體。

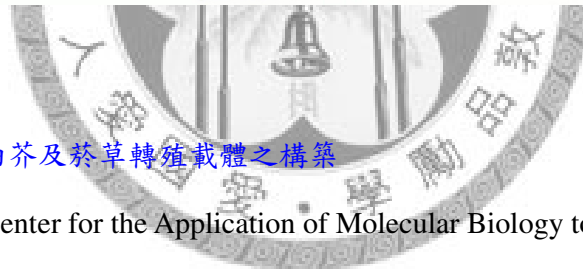
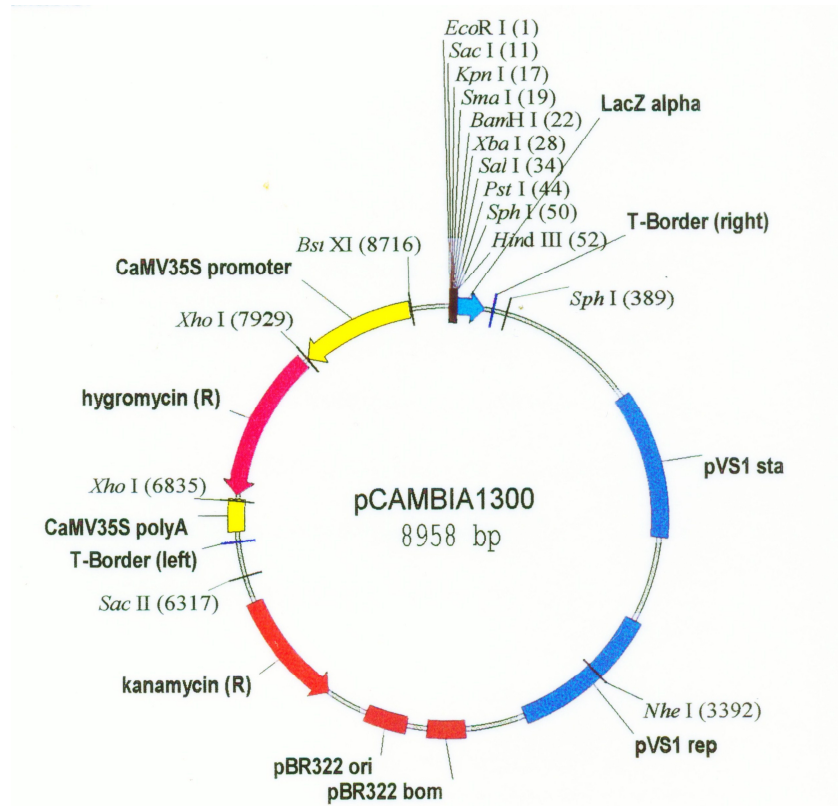
購買自 invitrogen 公司，圖片截取來自以下網站：

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



附錄十八、TRV-based VIGS vectors。

在進行 VIGS 實驗時總共需要兩種載體分別為 TRV-RNA1 (pTRV1) 與 TRV-RNA2 (pTRV2)，在 TRV-RNA1 的載體具有兩倍重複 CaMV 35S 啟動子 (2x35S) 編碼出相關蛋白，例如 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) 也有 nopaline synthase terminator (NOS_t) 終止結束轉錄，並在 T-DNA 兩端有 LB (left borders) 與 RB (right borders) 可以嵌入植物的細胞內，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)，還有目標基因的選殖位置 (multiple cloning sites, MCS)，可以將欲靜默的植物 cDNA 基因片段選殖至 TRV-RNA2。



附錄十九、阿拉伯芥及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、本研究中所使用的引子。

利用半定量 sqRT-PCR 檢測 VIGS 靜默效率所使用之引子

Silenced genes	Primer Sequences	Fragment Length (bp)
<i>SIERF B1a-1</i> (SGN-U581852)	F: 5'-CGTATCAGCACCTATGGCTGT-3' R: 5'-TGAACAACCGTTTCTCCGCT-3'	348
<i>SIERF B1a-2</i> (SGN-U575863)	F: 5'-GATTCGTCGTCGTCTGTGGT-3' R: 5'-CAGATCGCATCAAGACTCA-3'	379
<i>SIERF B1a-3</i> (SGN-U574883)	F: 5'-ACGCTTATCAACTTCATCTC-3' R: 5'-GGATCCCTTATCTCAGCAGAA-3'	260
<i>SIERF B1a-4</i> (SGN-U564953)	F: 5'-CACAGAGACCTACTTCAAGCA-3' R: 5'-AAGACATAGTGCTGTGCAG-3'	317
<i>SIERF B1a-5</i> (SGN-U564952)	F: 5'-AGCTTATGATGCTGCAGCTC-3' R: 5'-ACAGAAGACGATGAGTCACA-3'	321

SIERF B1a 基因使用 Sub-cellular localization 之引子

Genes	Primer Sequences
<i>SIERF B1a-1</i> (SGN-U581852)	F: 5'-ATGGCTGTGAAAGATAAGGCTG-3' R: 5'-TTAAACTTCCATAGGTGGCGCA-3 ^{1a} R: 5'-AACTTCCATAGGTGGCGCA-3 ^{1b}
<i>SIERF B1a-2</i> (SGN-U574883)	F: 5'-ATGCGCCACCGGAAGTCGTCGG-3' R: 5'-TCACCGTAACAGAAGGGTAAAT-3 ^{1a} R: 5'-CCGTAACAGAAGGGTAAAT-3 ^{1b}
<i>SIERF B1a-3</i> (SGN-U574883)	F: 5'-ATGCCCGTCGGAAAAATC-3' R: 5'-CTAGAAACACAAAGGGGTGATG-3 ^{1a} R: 5'-GAAACACAAAGGGGTGATG-3 ^{1b}
<i>SIERF B1a-4</i> (SGN-U564953)	F: 5'-ATGAGAAGAGGCAGAGCAACTC-3' R: 5'-TCAAAGACATAGTGCTGTGCAG-3 ^{1a} R: 5'-AAGACATAGTGCTGTGCAG-3 ^{1b}
<i>SIERF B1a-5</i> (SGN-U564952)	F: 5'-ATGAGAAGAGGCAGAGCAACTC-3' R: 5'-TCAAAGACATAGTGCTGTGCAG-3 ^{1a} R: 5'-AAGACATAGTGCTGTGCAG-3 ^{1b}

^a 包含停止密碼子的引子

^b 不含停止密碼子的引子

利用 Transactivation assay 檢測轉錄因子活性之引子設計

SIERF B1-a genes Primer Sequences	
<i>SIERF B1a-1</i> (SGN-U581852)	F: 5'-AGTCGACATGGCTGTGAAAGATAAGGCTG-3' R: 5'-AGTCGACTTAACTTCCATAGGTGGCGCA-3'
<i>SIERF B1a-2</i> (SGN-U574883)	F: 5'-ACCCGGGATGCGCCACCGGAAGTCGT-3' R: 5'-AGTCGACTCACCGTAACAGAAGGGTAAAT-3'
<i>SIERF B1a-3</i> (SGN-U574883)	F: 5'-ACCCGGGATGCCCCGTCGGAAAAATC-3' R: 5'-AGTCGACCTAGAAACACAAAGGGGTGATG-3'
<i>SIERF B1a-4</i> (SGN-U564953)	F: 5'-ACCCGGGATGCGGAGAAGCAGAGCAGC-3' R: 5'-AGTCGACTCAAAGACATAGTGCTGTGCAG-3'
<i>SIERF B1a-5</i> (SGN-U564952)	F: 5'-ACCCGGGATGAGAAGAGGCAGAGCAACTC-3' R: 5'-AGTCGACTCAAAGACATAGTGCTGTGCAG-3'

Real-time PCR 檢測 *SIERF B1a* 基因表現所設計之引子

Genes	Accession Number	Gene-Specific primers
<i>SIERF B1a-1</i>	SGN-U581852	F: 5'-CGGCGGAGATGAATAATGTT-3' R: 5'-TAACAACCTCCCGGTCTCCAC-3'
<i>SIERF B1a-2</i>	SGN-U574883	F: 5'-GTCGGAGCTGAAAAGACCAG-3' R: 5'-GTCAAAGGTACCCAGCCAAA-3'
<i>SIERF B1a-3</i>	SGN-U574883	F: 5'-ACGCTTATCAACTTCATCTC-3' R: 5'-GGATCCCTTATCTCAGCAGAA-3'
<i>SIERF B1a-4</i>	SGN-U564953	F: 5'-CCACCCATTAGTTTCACAGA-3' R: 5'-GTCTTCAACGACAGAAGACG-3'
<i>SIERF B1a-5</i>	SGN-U564952	F: 5'-ATCGGTAGTTGACCCGAGA-3' R: 5'-CCCTTACAATCACCATCT-3'

過量表現 *SIERF B1a-1* 與 *SIERF B1a-3* 於轉殖菸草之引子設計。

Genes	Gene-Specific primers
<i>SIERF B1a-1</i>	F: 5'-GGAATTCGCTGTGAAAGATAAGGCTG-3' R: 5'-AACTGCAGACTTCCATAGGTGGCGCA-3'
<i>SIERF B1a-3</i>	F: 5'-GGAATTCATGCCCCGTCGGAAAAATC-3' R: 5'-AACTGCAGGAAACACAAAGGGGTGATG-3'

Real-time PCR 檢測逆境處理後標誌基因表現之引子

Genes	Accession Number	Gene-Specific primers
<i>Pti4</i> (SA & ET)	U317071	F: 5'-GGATCAACAGTTACCACCGACG-3' R: 5'-ACCATCCGACGCTTAGAGCG-3'
<i>LeWIPI-2</i> (JA)	K03291	F: 5'-GACAAGGTACTAGTAATCAATTATCC-3' R: 5'-GGGCATATCCCGAACCCAAGA-3'
<i>SlAIM1</i> (ABA)	EU934734	F: 5'-CACTCTCACGTTGTGCTGGT-3' R: 5'-CAGTTCTCCCTGGCAAATGT-3'
<i>Dec17</i> (Drought)		F: 5'-GGCATCCGTTGAAGAGACTGTTGGT-3' R: 5'-CCTCCTCCTTGGGTTCCACTTCTTC-3'
<i>EF1a</i>	X14449	F: 5'-GATTGGTGGTATTGGAAGTGTGTC-3' R: 5'-AGCTTCGTGGTGCATCTC-3'

Real-time PCR 檢測轉殖株相關標誌基因表現之引子

Genes	Gene-Specific primers
<i>NtACS3</i>	F: 5'-CAAGTTTCGGGTTAGTTTCAACAC-3' R: 5'-GGCGAAGACATTGGAGCGTGA-3'
<i>NtACO3</i>	F: 5'-CACAGATGCAGGTGGAATCA-3' R: 5'-CAGTTGCTATGGGACCTAAGTTG-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'-GAACATGCTATTTCTCTGAGT-3' R: 5'-CTATTTCTTCCTCCTCATCACT-3'
<i>NtERD10D</i>	F: 5'-AGGAGAAGAAAGGATTCCTAGA-3' R: 5'-GGTCTTTGAGTGATATCCTGGTA-3'
<i>NtPR1</i>	F: 5'-GGTCAACACGGCGAAAACC-3' R: 5'-GCCTTAGCAGCCGTCATGA-3'
<i>NtPR2</i>	F: 5'-GAGTCCAAAGTGTCTCTGTGATA-3' R: 5'-GCAAACAATTTACCATCAGACCA-3'
<i>NtPR4</i>	F: 5'-GGCCAAGATTCCTGTGGTAGAT-3' R: 5'-CACTGTTGTTTGGAGTTCCTGTTCCCT-3'
<i>NtSAR8.2</i>	F: 5'-AAGTTGATGCAAGGGAGATGTCT-3' R: 5'-ATGACATTTAGGACATTTGCTGC-3'

附錄二十一、本研究常用培養基及藥劑

523 medium

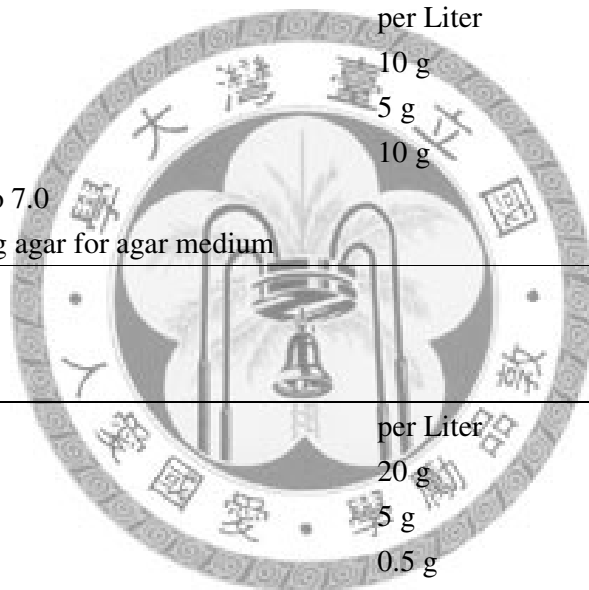
Component	per Liter
Casein hydrolysate	8 g
Sucrose	10 g
Yeast extract	4 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g
Agar	15 g

LB medium

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

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

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**

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

Co-culture

菸草

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

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

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

