

國立臺灣大學生命科學院植物科學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Plant Biology  
College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

印度梨形孢真菌與小白菜共生時之效應蛋白的分離與功  
能性探討

**Isolation and characterization of effector genes  
during symbiotic interaction between Chinese  
cabbage and *Piriformospora indica***

楊子平

Tzu-ping Yang

指導教授：葉開溫博士

Advisor: Kai-Wun Yeh, Ph.D.

中華民國 105 年 4 月

April, 2016

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

印度梨形孢真菌與小白菜共生時之效應蛋白的分離與功能性探討

Isolation and characterization of effector genes during symbiotic interaction between Chinese cabbage and *Piriformospora indica*

本論文係楊子平君 (R02B42016) 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 105 年 4 月 12 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：

中央研究院植物暨微生物學研究所 特聘研究員

林納生 研究員

林納生

中央研究院農業生物科技中心 研究員

詹明才 研究員

詹明才

臺灣大學農藝學系暨研究所 教授

王淑珍 教授

王淑珍

臺灣大學植物科學研究所 教授

鄭秋萍 教授

鄭秋萍

臺灣大學植物科學研究所 教授(指導教授)

葉開溫 教授

葉開溫



## 誌謝

在這近三年研究歷程的尾聲，我首先要感謝的是我的指導老師葉開溫教授。雖然我到此時此刻依然覺得這項研究主題太過博大精深，遠超出我的資質能力。但老師還是願意給我這個機會去挑戰，如何向一個真正未知的領域探索知識。儘管這是研究生教育的本質，但至今早已不是一個每個碩士學生都能擁有的寶貴經驗了。此外也要感謝鄭秋萍老師在植科所一直以來給我的建議與協助，每每給予我突破困難的助力。在 920 實驗室裡，我總是受到所有成員的照顧、體諒。真得很感激各位在生活上、實驗上都能不吝彼此幫忙與分享經驗，族繁不及備載，遺憾沒有辦法一一點名。但是我想特別感謝博士後研究員的丹筑學姐，總是不厭其煩的與我討論實驗並且指導技術，也常常交流我們共通的廚藝嗜好。因為有亦師亦友的你，我才有辦法走完這條研究的歷程。另外我也要感謝今年加入這個研究主題的守宸。在許多煩雜勞累的實驗項目中給了我極大的協助。相信你一定能在這個主題有更好的研究成果。最後要感謝我的家人，在任何情況下都願意理解我、支持我。這一年家裡經歷的各種挑戰，每一次都讓我更了解家的重要性，也更知道如何為家人著想與傾聽彼此。我永遠愛你們。

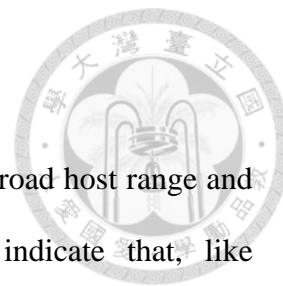
## 中文摘要



印度梨形孢真菌(*Piriformospora indica*, *P. indica*)為一宿主範圍極廣且極具農業應用價值的共生真菌。近年研究發現，共生性微生物能分泌效應蛋白(effector protein)來調節植物的生理，建立與宿主的共生關係，並且帶給宿主益生效應。然而，其種類與機制上的研究至今極少。對 *P. indica* 效應蛋白的研究有助於建立菌根菌與植物間共生機制的良好模型。因此，本研究的研究目的著重於 *P. indica* 效應蛋白基因之篩選與鑑定，並且探討這些基因在 *P. indica* 與植物交互作用時扮演的角色。首先透過生物資訊方法、雙重扣減式 cDNA 基因庫與現有研究文獻進行候選基因的篩選，並且透過檢測共生階段的基因表現樣態與細胞次定位分析驗證預測的結果。本研究進一步針對 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 這兩個受到共生現象誘導、並且座落於植物細胞核的效應蛋白候選基因進行分析。我們藉由建立小白菜毛狀根轉殖系統與大腸桿菌純化蛋白系統，從基因與蛋白層次探討候選基因對植物生理與免疫反應的影響。在毛狀根系統中，*PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 會造成水楊酸 (SA) 路徑指標基因 *PR1* 之表現顯著下降，並且促進 *P. indica* 與植物共生。而茉莉酸路徑指標基因 *PDF1.2* 之表現則沒有明顯受調控的現象。利用外加純化蛋白處理分析所得的結果中，我們也發現 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 對於 *PR1* 與 *PDF1.2* 的影響與毛狀根系統中的結果一致。我們推論 *P. indica* 可能藉由 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 抑制植物 SA 防禦反應，以建立與植物的共生關係。另外，在毛狀根系統中也發現 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 可以造成氧化還原相關基因 *DHAR5* 與 *GSTU* 的表達量顯著提升，我們推論這亦是因為 SA 路徑被壓抑所間接造成之現象。

關鍵字：印度梨型孢真菌、效應蛋白、氧化還原狀態、植物防禦反應、共生

## 英文摘要



*Piriformospora indica* is a mutualistic endophyte with a broad host range and great application potential in agriculture. Recent studies indicate that, like pathogenic microbes, mutualistic microbes use effector proteins to adjust plant physiology resulting a promotion of symbiosis with plant. The study of *P.indica* effector proteins and their mechanism can be a great model for endophyte symbiosis. Consequently, the objective of our study is to establish a examine system for identification and functional characterization of *P.indica* effector proteins. Based on previous studies, double subtractive cDNA library and bioinformatics methods, we picked nine genes to exam their expression pattern during symbiosis stage and the subcellular localization in plant cell. *PIIN\_09643* and *PIIN\_11103* are both induced during symbiosis stage, and their encoded proteins have the subcellular localization in nucleus. For functional study of these putative effector genes, we established transgenic hairy-root system of Chinese cabbage and recombinant protein system of *Escherichia coli* to investigate the role of these genes during symbiosis. In hairy-root system, we found *PIIN\_09643* and *PIIN\_11103* significantly suppress the expression level of SA pathway marker gene, *PR1*; and cause a promotion of symbiosis colonization. However, for JA pathway marker gene, *PIIN\_09643* and *PIIN\_11103* do not directly regulate the expression level of *PDF1.2*. As the supporting data, the treatment of *PIIN\_09643* and *PIIN\_11103* recombinant protein to Chinese cabbage leaves show a similar effect on expression level of *PR1* and *PDF1.2*. It suggests that *P. indica* apply *PIIN\_09643* and *PIIN\_11103* to suppress SA response, and further facilitate the symbiosis process in *planta*. Moreover, we found *PIIN\_09643* and *PIIN\_11103* can enhance the expression level of redox status

relative genes, *DHAR5* and *GSTU*. It might be the indirect result of the down-regulation of SA pathway.



Keywords: *Piriformospora indica*, effector protein, redox status, defense response, mycorrhizal symbiosis.

# 目錄



誌謝 .....	i
中文摘要 .....	ii
英文摘要 .....	iii
目錄 .....	v
圖表目錄 .....	vii
附錄目錄 .....	viii
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
第一節 印度梨形孢真菌 ( <i>Piriformospora indica</i> ) .....	1
第二節 植物與微生物間之交互作用與防禦反應 .....	4
第三節 效應蛋白 (effector proteins) .....	6
第四節 研究目的 .....	10
<b>第二章 材料與方法 .....</b>	<b>11</b>
第一節 實驗材料 .....	11
第二節 <i>P. indica</i> 與小白菜之共生 .....	11
第三節 基因表現量測定 .....	13
第四節 製備雙重扣減式 cDNA 基因庫 .....	14
第五節 生物資訊分析方法 .....	23
第六節 阿拉伯芥葉肉原生質體之分離與轉形 .....	24
第七節 阿拉伯芥原生質體細胞次定位分析 (subcellular localization) .....	25
第八節 以農根菌 A4 品系產生小白菜轉殖毛狀根 .....	26
第九節 真菌共生量測定 .....	27

第十節 純化候選基因之重組蛋白 .....	28
第十一節 純化蛋白處理 .....	29
第十二節 其他基本實驗技術 .....	30
<b>第三章 結果 .....</b>	<b>33</b>
第一節 <i>P. indica</i> 效應蛋白候選基因之篩選 .....	33
第二節 候選基因毛狀根系統 (hairy root system) 之建立與鑑定 .....	37
第三節 利用毛狀根系統探討候選基因於植物中可能的生理功能 .....	38
第四節 候選基因純化蛋白 (recombinant protein) 系統之建立 .....	41
第五節 利用純化蛋白系統探討候選基對植物防禦相關基因的影響 .....	42
<b>第四章 討論 .....</b>	<b>44</b>
第一節 <i>P. indica</i> 效應蛋白候選基因之預測 .....	44
第二節 PIIN_09643 與 PIIN_11103 於植物細胞中的次細胞定位 .....	45
第三節 PIIN_09643 與 PIIN_11103 對植物氧化還原狀態相關基因的影響 ....	46
第四節 PIIN_09643 與 PIIN_11103 對 PTI 反應指標基因與共生效率的影響	47
第五節 PIIN_09643 與 PIIN_11103 於共生時可能扮演的角色與機制 .....	49
第六節 未來展望 .....	50
<b>參考文獻 .....</b>	<b>51</b>
<b>圖表 .....</b>	<b>59</b>
<b>附錄 .....</b>	<b>80</b>



## 圖表目錄

表一、雙重扣減式 cDNA 基因庫定序 <i>P. indica</i> 與小白菜共生後特異表現之基因 ....	59
表二、經 BaCelLo 與 Cell-PLoc 分析後所得十個候選基因與其特性.....	61
圖一、由生物資訊學方法自 <i>P. indica</i> 基因體中挑選候選效應蛋白基因.....	62
圖二、九個候選基因產物大小與功能性區段分布情形 .....	63
圖三、候選基因於 <i>P. indica</i> 感染階段之表現樣態 .....	64
圖四、PIIN_05990、PIIN_09643、PIIN_11103 於 <i>P. indica</i> 感染階段之表現樣態 .....	65
圖五、PIIN_05990、PIIN_09643 與 PIIN_11103 蛋白之次細胞定位 .....	66
圖六 <i>PIIN_09643</i> 與 <i>PIIN_11103</i> 候選基因核苷酸序列與胺基酸序列特性分析.....	67
圖七、 <i>PIIN_09643</i> 與 <i>PIIN_11103</i> 過表現於小白菜毛狀根系之基因表現分析.....	68
圖八、 <i>PIIN_09643</i> 與 <i>PIIN_11103</i> 過表現於小白菜毛狀根系之蛋白表現分析.....	69
圖九、生長素反應相關基因於候選基因過表達之毛狀根系中之基因表現分析.....	70
圖十、氧化還原狀態相關基因在候選基因毛狀根系中之基因表現分析 .....	71
圖十一、植物 PTI 反應防禦基因在候選基因毛狀根系中之基因表現分析 .....	72
圖十二、 <i>P. indica</i> 共生時 PTI 反應相關基因在毛狀根系中之基因表現分析.....	73
圖十三、 <i>P. indica</i> 於候選基因毛狀根系中的共生效率 .....	74
圖十四、候選基因純化蛋白系統的誘導純化 .....	75
圖十五、半乳糖結合蛋白的切除 .....	76
圖十六、候選基因重組蛋白對植物 PTI 反應防禦相關基因的影響 .....	77
圖十七、候選基因 PIIN_09643 蛋白對於病原菌致病力的影響.....	78
圖十八 PIIN_09643 與 PIIN_11103 於共生時可能扮演的角色與機制 .....	79

## 附錄目錄



附表一、引子序列 .....	80
附表二、檢索表 .....	82
附錄圖一、雙重扣減式 cDNA 基因庫製備流程示意圖 .....	84
附錄圖二、阿拉伯芥原生質體細胞次定位分析之載體構築 .....	85
附錄圖三、轉殖毛狀根系使用載體構築 .....	86
附錄圖四、以農根菌品系 A4 產生小白菜轉殖毛狀之流程示意圖 .....	87
附錄圖五、檢測共生量時真菌接種之示意圖 .....	88
附錄圖六、候選基因純化蛋白系統使用載體 .....	89
附錄圖七、植物體中 antioxidant recycling 示意圖 .....	90
附錄圖八、植物體內防禦反應路徑示意圖 .....	91
候選基因序列： .....	92



## 第一章 前言

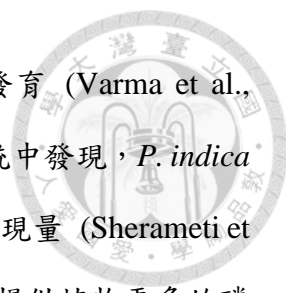
### 第一節 印度梨形孢真菌 (*Piriformospora indica*)

#### 1.1.1 發現、型態與分類學

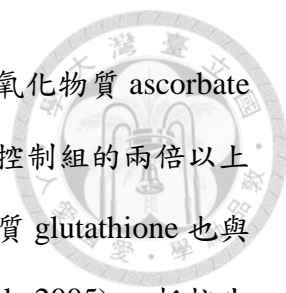
印度梨形孢真菌 (*Piriformospora indica*, *P. indica*) 在 1998 年首次被發現於印度西部的塔爾沙漠 (Thar desert)。此真菌是植物內生性菌根菌 (root endophyte)，其菌絲 (hyphae) 能與寄主植物根部具有根毛 (root hair) 的成熟部皮層 (cortex) 形成共生菌根 (mycorrhizae) (Verma et al., 1998)。此真菌生長初期時菌絲為白色，而後逐漸成褐色。*P. indica* 的菌絲為具隔膜 (septum) 的多核菌絲 (multinucleated hyphae)，並且於成熟階段在菌絲末端形成梨形 (pear-shaped) 的厚膜孢子囊 (chlamydospore)，內部具有 8-25 個細胞核 (Varma et al., 2012)。基於解剖型態與 18S rDNA 序列的分析，*P. indica* 被歸類在擔子菌綱 (Basidiomycetes)，蠟殼耳目 (Sebacinales)、蠟殼耳科 (Sebacinaceae) 的梨形孢屬 (*Piriformospora*) (Weiss et al., 2004; Waller et al., 2007)。

#### 1.1.2 *P. indica* 與植物之交互作用與影響

*P. indica* 隨後被發現是一種對植物非常有助益的內共生菌 (endophytic fungi)，其與植物的交互作用有三項重要的特質。其一，*P. indica* 與其他內生性菌根菌相比具有相當廣大的寄主範圍 (host range)，從苔蘚植物到被子植物皆能與之共生，目前已經有約 150 個物種被報導可跟 *P. indica* 進行共生 (Varma et al., 2012)，包含模式植物阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 以及多種重要糧食作物如水稻 (*Oryza sativa*)、大麥 (*Hordeum vulgare*) 等，可以推論其感染植物的方式可能是藉由影響廣泛存在於植物體內的路徑所進行。其二，*P. indica* 的共生已在多個物種上被證明，可以改善植物的營養生長與生殖生



長。營養生長方面，*P. indica* 可以促進多種植物根系的發育 (Varma et al., 1999)。例如在阿拉伯芥與菸草 (*Nicotiana tabacum*) 的系統中發現，*P. indica* 可以提高植物體內氮同化基因 *Nia2* (nitrate reductase2) 的表現量 (Sherameti et al., 2005)，而 *P. indica* 亦會提高自身磷運輸系統的效率以提供植物更多的磷分 (Yadav et al., 2010)。這些因素使植物更能吸收水分與所需的無機養分，因而可能造成植物生長勢與生物量的提升。在生殖生長方面，Das 等人的研究指出，毛喉鞘蕊花 (*Coleus forskohlii*) 以 2% 介質重的 *P. indica* 菌絲在田地共培養以後，能使花期提前至少一週 (Das et al., 2012)。當植株成長到六個月大時，開花率能比控制組高出 50%，花序的數量與長度也達到控制組的兩倍。而 Waller 等人將大麥與 *P. indica* 在盆中進行共培養，與真菌的共生的植株因為分蘗數增加，使得終產量超出控制組 11% 之多 (Waller et al., 2005)。其三，*P. indica* 的共生能改善植物對於抵抗生物逆境 (biotic stress) 與非生物逆境 (abiotic stress) 的能力。溫度逆境方面，Murugan 等人的研究中，以 *P. indica* 處理可以提高多種十字花科作物種子在低溫下的發芽率 (Murugan, 2011)。乾旱逆境方面，小白菜 (*Brassica rapa chinensis*) 與 *P. indica* 共生後以 20% 的 polyethylene glycol (PEG) 4000 灌溉介質，96 小時以後可以觀察到葉片中的 peroxidases (POD)、superoxide dismutases (SOD)、catalases (CAT) 等抗氧化酶活性較控制組提高 50~100% 不等，同時，葉綠體中影響葉片氣孔開關的  $Ca^{2+}$ -sensing (CAS) regulator 的 mRNA 表現量、蛋白表現量也有所提升，最後使得乾旱傷害指標物質 malondialdehyde (MDA) 與控制組比較下降了 50% 之多 (Sun et al., 2010)。同樣牽涉水分與滲透壓的環境壓力，*P. indica* 亦可以藉由提升植物氧化還原酵素的效率，以減輕鹽逆境對植物的傷害 (Baltruschat et al., 2008)。大麥與 *P. indica* 共生以後處理 300 mM 的 NaCl，根部中去除超氧化物的酵素：ascorbate peroxidase (APX)、CAT、glutathione reductase (GR)、monodehydroascorbate reductase (MDAR)、dehydroascorbate reductase (DHAR)



等，酵素活性均被明顯提升。最後導致植物體中最主要的抗氧化物質 ascorbate 總含量與 redox-ratio 提升到控制組的五倍、生物量也達到控制組的兩倍以上 (Baltruschat et al., 2008) 。此外，植物體中次要的抗氧化物質 glutathione 也與 ascorbate 一樣有總含量、redox-ratio 提升的結果 (Waller et al., 2005) 。抵抗生物性逆境方面，大麥、阿拉伯芥、番茄 (*Solanum lycopersicum*) 等作物與 *P.indica* 共生以後，對多種鐮孢菌屬 (*Fusarium species*) 與數種其他屬的病原菌展現更高的抗性 (Waller et al., 2005; Qiang et al., 2012) 。目前認為 *P. indica* 可能藉由增強茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 路徑調控的 induced systemic resistance (ISR) ，以促使植物更能抵抗病原菌的侵襲 (Stein et al., 2008) 。由於上述的優良性質，全球研究者們對 *P. indica* 的興趣日益增加，期望對 *P. indica* 的了解能為內生性菌根菌與植物之間的交互作用提供一個良好的研究模式，也期望將 *P. indica* 系統性地應用在農業栽培與植物產業上。

### 1.1.3 *P. indica* 於植物根部共生過程之進程與生命週期

根據 Jacobs 等人的研究，*P. indica* 與阿拉伯芥的共生過程可以依據特性分為四個階段 (Jacobs et al., 2011) 。*P. indica* 的菌絲或孢子與植物根部接觸以後的第 0 天到第 3 天會引發植物 SA 路徑的防禦反應，並且只能在根部皮層 (cortex) 外的細胞間隙進行感染 (intercellular colonization) ，屬於共生階段的初期；而接觸植物以後的第 3 天到第 7 天，*P. indica* 開始緩和植物 SA 路徑的防禦反應，並且開始大量進入根部皮層內進行 intracellular colonization，屬於共生階段的中期；與植物接觸的第七天之後，*P. indica* 會引發植物部份根部細胞的 program cell death，並且在這些凋亡細胞產生的空間中形成孢子。直到接觸植物後的第 14 天，孢子成熟後完成在植物體中的生命週期，屬於共生階段的晚期。

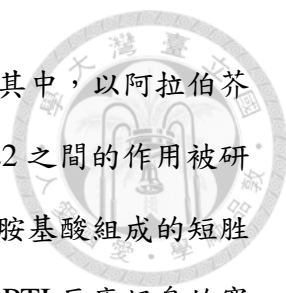


## 第二節 植物與微生物間之交互作用與防禦反應

自然界中，陸生植物與無數的微生物共存著。一般情況下，植物能藉由體表的角質或蠟質避免微生物直接侵襲植物細胞。但若植物體受到傷害而使微生物入侵，植物的免疫系統能藉由細胞膜上的穿膜受體，pattern recognition receptor (PRR) 來辨認常伴隨著微生物出現的小分子，pathogen-associated molecular pattern (PAMP)，如 chitin、flagellin、bacteria elongation factor Tu (EF-Tu) 上保守的結構。接著引發訊息傳遞途徑，啟動超氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 生成、胙質累積 (callose deposition)、產生抗菌物質如 phytoalexin、pathogenesis-related proteins (PR proteins) 等防禦機制抵抗微生物的入侵，稱為 PTI 反應 (PAMP-triggered immunity response)。為了能對植物進行寄生，病原菌能製造出一類稱為效應蛋白 (effector proteins) 的小型分泌蛋白 (small secreted proteins) 以壓抑植物的 PTI 反應，或是影響植物的生理，使自身能順利在植物體中傳播、生長與生殖 (Boller and Felix, 2009)。在天擇壓力下，植物能演化出高專一性的 resistant proteins (R proteins) 來辨識效應蛋白，並且針對效應蛋白所屬的微生物強化 PTI 反應的防衛，稱為 ETI 反應 (effector-triggered immunity response)。而病原菌也有可能演化出更多的效應蛋白干擾 R proteins 的功能，這種植物與病原菌間如同軍備競賽的共演化 (coevolution) 現象有學者以 zigzag model 來描述之 (Jones et al., 2006)。

### 1.2.1 植物的 PTI 反應 (PAMP-triggered immunity response)

當微生物突破植物體表的角質與蠟質進入植物體後，植物細胞能利用細胞膜上的 PRR 辨認微生物身上的 PAMP 以啟動 PTI 反應，使植物免於大多數微生物的感染。一般來說，典型的 PTI 反應包括 mitogen activated protein kinase (MAPK) 的活化、膜間鈣離子流 ( $\text{Ca}^{2+}$  ion fluxes) 的產生、ROS 的生成、細胞壁的修飾與防禦基因的啟動 (Jones et al., 2006)。



近年來 PRR 與 PAMP 的種類與辨認機制被積極研究。其中，以阿拉伯芥中的 PRR：FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) 與 PAMP：flg22 之間的作用被研究得最透徹。flg22 是細菌 flagellin N-terminal 上的二十二個胺基酸組成的短肽，能廣泛的在多種植物上引起 PTI 反應。FLS2 則是觸發 PTI 反應訊息的穿膜 leucine repeat receptor like kinase (LRR-RLK)。當 flg22 存在時，FLS2 能與 flg22 結合，並且會與作為 coreceptor 的 receptor-like kinase, Brassinosteroid insensitive1 (BRI1) -associated receptor kinase (BAK1) 形成 heterodimer 的 complex，觸發 PTI 反應的訊息途徑 (Zhou and Chai, 2008)。類似於 FLS2-flg22 的模式，其他種類 PAMP 的辨認與下游啟發 PTI 反應的途徑，也由 RLK 所啟動，如阿拉伯芥中辨識 chitin 的 lysin motif (LysM) -RLKs，AtCERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1) (Miya et al., 2007; Shimizu et al., 2010)；以及辨識 EF-Tu 保守片段 elf18 的 LRR-RLK，ERF (PRR elongation factor receptor) (Kunze and Zipfel, 2004; Zipfel, 2008)。並且在辨識 PAMP 後形成 homodimer complex 或與 coreceptor 形成 heterodimer complex，以觸發訊息傳遞途徑 (Kale and Tyler, 2011)。

### 1.2.2 植物的 ETI 反應 (effector-triggered immunity response)

ETI 反應最早是在 Flor 等人用遺傳學方法探討亞麻 (*Linum usitatissimum*) 抗病品系與真菌 *Melampsora lini* 毒性品系的研究中以 gene-for-gene model 被描述 (Flor et al., 1955)。演化出效應蛋白的病原菌可以藉由不同機制來壓抑植物的 PTI 反應，進而造成植物感病 (effector triggered susceptibility, ETS)。而抗病的植物品系則能演化出 nucleotide binding leucine rich repeat (NB-LRR) 類型的 R proteins 來辨識病原的效應蛋白，並且重新啟動免疫反應，也就是 ETI 反應 (Jones et al., 2006)。一般來說，ETI 反應是在速度與程度上作 PTI 反應的強化，並且具有種對種的專一性。此外，在面對 biotrophic 的病原時，植物

的 ETI 反應也常常以過敏反應 (hypersensitive cell death response, HR) 將病原限制在凋亡的組織，避免病原進一步的擴散 (Jones et al., 2006; Schwessinger et al., 2008; Zipfel et al., 2008)。




### 1.2.3 植物初期防禦反應於植物與微生物交互作用中所扮演的角色

PTI 反應為植物提供了重要的保護，使植物面對環境中大多數的微生物時不會遭受感染；而若感染狀態下，PTI 反應的強弱也決定了植物病徵的程度和發展速度 (He et al., 2006)。因此，植物 PTI 反應對於微生物是否能成功感染植物扮演著重要的角色 (Zipfel et al., 2004)。目前已知，PTI 反應的產生由多種植物激素如 JA、水楊酸 (salicylic acid, SA)、乙烯 (ethylene) 的下游反應所調控 (Tsuda et al., 2009)。大體來說，SA 的下游反應能有效幫助植物對抗 biotrophic 病原，而 JA/ethylene 的下游反應則能保護植物免於 necrotrophic 病原的侵襲 (Glazebrook et al., 2005)。而 Schafer 與 Jacob 等人也分別在大麥與阿拉伯芥上，探討 PTI 反應對於共生菌根菌 *P. indica* 建立共生關係所扮演的角色為何。結果指出，*P. indica* 與植物進行共生時能減緩植物 SA 相關的 PTI 反應和 *PR1*、*PR10*、*WRKY22*、*CBP60g* 等標誌基因的表現 (Schafer et al., 2009; Jacobs et al., 2011)。而在 SA 路徑較強表現的植株中，如阿拉伯芥 *jin1-1*、*jar1-1*、*gal-6*、*quintuple-DELLA*，大麥 M117 與 M121 等，*P. indica* 與植物的共生效率較低。同時，在 SA 路徑較弱表現的植株中，如阿拉伯芥 *eds1*、*pen2-1*、*cerk1* 等，*P. indica* 與植物的共生效率則較高 (Schafer et al., 2009; Jacobs et al., 2011)。因此，與病原菌的模式類似，植物 PTI 反應對於共生菌根菌能否在植物根部進行共生也至關重要。

### 第三節 效應蛋白 (effector proteins)

效應蛋白在早期研究的定義泛指能改變宿主細胞的構造、功能與免疫反





應，並藉此幫助微生物對植物進行感染與寄生的小分子 (Kamoun et al., 2003; Huitemaet al., 2004)。然而在後續的研究中逐漸明瞭，植物的免疫反應分為兩個階段所進行 (上述之 PTI 反應與 ETI 反應)。在原先的定義下，容易將一些 PAMP 或者微生物所產生的一些毒素 (toxin) 與真正引起 ETI 反應的效應蛋白混為一談。因此，基於目前對於植物微生物交互作用的了解，效應蛋白應是指稱微生物用以改變植物細胞的結構與生理機制，將植物體內的環境調整為利於寄生或共生的小型分泌蛋白 (Win et al., 2012)。

細菌 (bacteria)、卵菌 (oomycete)、真菌 (fungi) 等微生物都能製造效應蛋白，而這些效應蛋白的作用位置能在宿主細胞外 (extracellular)、宿主與微生物的細胞間隙 (intracellular)、宿主細胞內 (intercellular) 的各種胞器中。作用的機制與所影響植物生理的途徑也都不盡相同。並且，由於效應蛋白屬於微生物與植物共演化下的產物，彼此間歧異度相當高，加上常有種與種間的專一性。以上因素都造成研究效應蛋白的困難度。

目前對於細菌的效應蛋白了解最多。由於細菌的第三型效應蛋白 (type 3 effector protein, T3Es) 大多需要細菌以第三型分泌系統 (type 3 secretion system) 打入宿主細胞中 (Erhardt et al., 2010; Tseng et al., 2009)。研究者們可以藉由預測蛋白產物是否具有保守的第三型分泌系統結合位來篩選出候選基因。此外，許多細菌第三型效應蛋白具有酵素活性來影響宿主的生理功能，因此亦可以藉由預測蛋白產物是否具有酵素活性的功能性區段 (functional domain) 以進行篩選。

大多數的卵菌 (oomycete) 效應蛋白在 N-terminal 的訊息胜肽 (signal peptide) 尾端帶有序列保守的 RXLR (arginine, any amino acids, leucine and arginine) motif 或是 crinkler (CRN) (LFLAK, leucine, phenylalanine, leucine, alanine and lysine) motif 做為 translocation signal 幫助效應蛋白運輸到作用的位置，而 C-terminal 則是效應蛋白的功能性區段 (Kale and Tyler, 2011)。RXLR

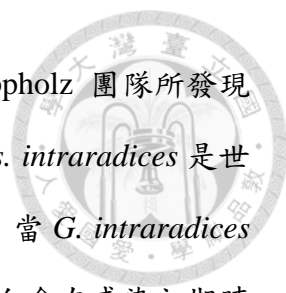
motif 與 CRN motif 這些具運輸功能的保守性區段亦能用以篩選候選基因。而目前對真菌效應蛋白的了解最少，因此還沒發現與細菌或卵菌效應蛋白相似的特性，可應用於候選基因的篩選。



### 1.3.1 共生真菌的效應蛋白

共生性微生物能幫助植物從陸生環境中吸收足夠的水分與無機養分，並且以此與植物交換有機養分得以生存。然而，共生是一項極其複雜的過程。共生性微生物需要對植物體釋放訊息、大幅度的改變植物的生理，包括：減緩植物的免疫反應、提升植物醣運輸蛋白的基因表現以獲取碳源及改變植物細胞壁結構以便進入植物體中 (Plett and Martin, 2011)。


2011 年 Plett 等人與 Kloppholz 等人首次報導了兩個共生性真菌效應蛋白的研究 (Plett et al., 2011; Kloppholz et al., 2011)。Plett 等人發現當共生真菌 *Laccaria biocolor* 接觸白楊 (*Populus trichocarpa*) 根部之後，會在感染初期大量分泌效應蛋白 MiSSP7 (mycorrhizal induced small secreted protein 7) (Martin et al., 2008)，並以 RNAi 的方式證實 MiSSP7 對於外生菌根構造 Hartig net 形成的深度與廣度扮演著重要的角色；另外也以合成 MiSSP7 蛋白，並且處理植物的方式證明 MiSSP7 可以藉由 C-terminal 的 RALG (Arginine, Alanine, Leucine and Glycine) domain 與植物細胞膜上的磷脂質 phosphatidylinositol 3-phosphate 結合，並且藉由胞飲作用進入植物細胞內，最後被送入細胞核中，使根系發育的相關基因如 *AUX/IAA* 等基因產生正調控；並且使根系發育抑制基因 *CLE5* 產生負調控，因而可能使植物細胞進行細胞壁的修飾，並且改變生長素的分布，進而使植物根系的發育有所促進 (Plett et al., 2011)。而該研究團隊後續也在 2014 年發現 MiSSP7 作用的主要機制是藉由與白楊樹中根部細胞核內 PtJAZ6 中的 JAZ domain 結合，使 PtJAZ6 這個 JA 路徑的負調控者不容易被降解，因而影響了 JA 相關的基因表現，最後造成促進共生的作用 (Plett et al., 2014)。



另一個證明效應蛋白於共生菌根作用的例子是由 Klopffholz 團隊所發現的 SP7 (secreted protein 7) (Klopffholz et al., 2011)。*Glomus intraradices* 是世界上最普遍的叢枝菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungus)，當 *G. intraradices* 與藜蒺苜蓿 (*Medicago truncatula*) 根組織接觸時，SP7 蛋白會在感染初期時被大量分泌到植物的細胞核中。並且同樣對於叢枝菌根構造 arbuscular mycorrhizae 形成的深度與廣度扮演著重要的角色。Yeast-two hybrid 的實驗結果指出，SP7 會與在核中與轉錄因子 MtERF19 交互作用，並且抑制由 ERF19 所調控的防禦相關基因如 *PR10-1* 的表現量。當將 SP7 在植物或病原菌過度表達時，植物宿主對病原菌的防禦反應均比 SP7 不存在時還低，以至於提高病原菌在植物體中的含量。因此說明，SP7 蛋白能減輕植物對微生物的防禦反應，並且幫助 *G. intraradices* 在植物體中建立共生關係。這些研究說明了，效應蛋白應該廣泛存在於共生性真菌中，並且可以幫助共生關係的建立以及益生效益的發生。

### 1.3.2 *P. indica* 中的效應蛋白候選基因

儘管目前已經發現了 MiSSP7 與 SP7 這兩種共生真菌的效應蛋白，研究者們依然對於共生真菌效應蛋白的種類與機制不甚了解。從過去在真菌中發現的效應蛋白中，大多包含兩個特性：當在植物體中共生或寄生時，表現量會被提升；基因產物為具有訊息胜肽的小型分泌蛋白（小於三百個胺基酸）(Martin et al., 2008; Zuccaro et al., 2011)。並且，這些蛋白常是功能未存在於現有資料庫中的蛋白。*P. indica* 的基因組在 2011 年時完成解序 (Zuccaro et al., 2011)。結果發現在 *P. indica* 基因組中預測有數百個小型分泌蛋白基因。並且其中許多基因能在與植物共生時提昇表現量。因此 Zuccaro 等人進一步對 *P. indica* 的小型分泌蛋白基因進行胺基酸的序列分析，結果發現一群具有保守性 motif、功能未知的小型分泌蛋白，命名為 DELD 蛋白。這些 DELD 蛋白大小



範圍在 100-130 個胺基酸，並具有 C-terminal 序列為 RSIDE<sub>2</sub>LD 的保守性 motif。此外，DELD 蛋白也存在於其他梨形孢屬的共生真菌 *Piriformospora williamsii* 中 (Rafiqi et al., 2013)。因為這些分析結果，DELD 蛋白中有些成員被認為可能具有效應蛋白的功能，唯尚無證據支持。

#### 第四節 研究目的

如上述前言所說明，*P. indica* 對植物生長及抗逆性的促進效益具有相當高的農業應用價值，而其與植物間的共生機制未臻完全明瞭，是一個相當值得投入研究的新主題。近年來關於共生性真菌效應蛋白的研究指向 *P. indica* 與植物之間建立共生的作用機制應該也是與效應蛋白調控寄主植物的基因表達相關。然而至今對於共生性微生物效應蛋白的種類與作用機制依然非常有限。有鑒於 *P. indica* 廣大的宿主範圍，對 *P. indica* 效應蛋白的研究有助於建立研究菌根菌與植物間共生機制的良好模型。因此，本研究的研究目的著重於 *P. indica* 效應蛋白基因之篩選與鑑定，並且探討這些基因在 *P. indica* 與植物交互作用時扮演的角色。主要透過生物資訊方法、雙重扣減式 cDNA 基因庫與過去研究文獻進行候選基因的篩選，並且透過檢測共生階段基因表現量與細胞次定位分析驗證預測的結果。同時針對符合預期的目標基因建立小白菜的毛狀根系統與大腸桿菌純化蛋白系統，從基因與蛋白層次探討目標基因對植物的生理與免疫反應的影響。



## 第二章 材料與方法

### 第一節 實驗材料

使用植物：小白菜 (*Brassica rapa chinensis*)，栽培品種為日本 Tokita 種子公司之 Chinese cabbage, Tokyo bekana。阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) ecotype Col-0。

使用真菌：印度梨型孢真菌 (*Piriformospora indica*)，菌種由德國 Jena 大學，Ralf Oelmu"ller 教授提供。

使用細菌：大腸桿菌 (*Escherichia coli*) strain DH5 $\alpha$ 、codon。農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) strain GV3101。農根菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) strain A4。

使用載體：pEarleyGate101、p2GWF7、p2YGW7、pCAMBIA1300、pMALc5x，載體為 Invitrogen™ 產品。

使用基因：PIIN\_05990、PIIN\_09643、PIIN\_11103。

### 第二節 *P. indica* 與小白菜之共生

#### 2.2.1 小白菜之無菌栽培

1. 取適量小白菜種子裝於 50 mL 離心管中。
2. 加入 30 mL 75% 酒精搖勻後馬上瀝乾。
3. 加入 30 mL 1% 漂白水搖勻 12 分鐘後瀝乾。
4. 加入 30 mL 無菌水搖勻 3 分鐘後瀝乾，重複三次。

均勻放置於 1/2 MS 固態培養基 (sucrose (2%)、MS (w/ MS vitamin) (2.2 g/L)、phytal agar (0.8%)，pH (5.6~5.8))。

5. 放置於長日照光照培養室中待其生長三天作為與 *P. indica* 共生或是農根菌

轉殖之樣品。



### 2.2.2 *P. indica* 繼代培養

1. 打開 Kaefer (KF) 固態培養基 (D-glucose (20 g/L) 、Peptone/tryptone (2 g/L) 、Yeast extract (1 g/L) 、Casein hydrolysate (1 g/L) 、Macronutrient mix (20x) (50 mL/L) 、Micronutrient mix (100x) (10 mL/L) 、Fe-EDTA (100x) (1 mL/L) 、Vitamin mix (100x) (1 mL/L) 、Agar (10 g/L) ，(pH6.5) )，於無菌操作台吹乾多餘水分。
2. 鑷子以 95%酒精消毒、過火冷卻後，打開真菌培養皿，以鑷子夾取 1 mL tip，手握 tip 尖端，以 tip 底部為模，於 plate 上蓋出圓形真菌塊。
3. 針頭過火消毒，以針頭挑起真菌塊，放置於 KF 固態培養皿中，菌塊上菌絲面朝下貼住培養基。
4. 放置於 28° C 生長箱培養，約 5 到 7 天後可收取真菌為其他實驗使用。

※ 液態培養則去除 KF 固態培養基之 Agar

Macronutrient mix (20x) :  $\text{NaNO}_3$  (12 g/L) 、KCl (10.4 g/L) 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10.4 g/L) 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (30.4 g/L)

Micronutrient mix (100x) :  $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、ammonium molybdate

Fe-EDTA (100x) :  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (0.77 g/50 mL) 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.556 g/50 mL) ，以鹼滴定到 pH 值至 3 以上、6 以下

Vitamin mix (100x) : thiamine (10 g/100 mL) 、glycine (0.04 g/100 mL) 、nicotinic acid (0.01 g/100 mL) 、pyridoxine ( 0.01 g/100 mL)



### 2.2.3 *P. indica* 與小白菜共培養

1. 選擇下胚軸長度一致的 3 天大小白菜幼苗，放置於新的 1/2MS 固態培養基中培養，並分出對照組與實驗組。
2. 對照組小白菜以透氣膠帶封口，避免汙染。
3. 鑷子以 95% 酒精消毒、過火冷卻後，打開真菌培養皿，以鑷子夾取 1 mL tip，手握 tip 尖端，以 tip 底部為模，於 plate 上蓋出圓形真菌塊，以鑷子夾取真菌塊後放置植物成熟根部旁約 0.5 cm 的距離，此為實驗組小白菜。
4. 將實驗組小白菜以透氣膠帶封口，待後續實驗使用。


## 第三節 基因表現量測定

### 2.3.1 以反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 鑑定基因表現量

1. 以方法 2.13.2 合成的第一股 cDNA 為模板，採用 5' 和 3' 的 internal control gene primer。於儀器中進行 PCR， $T_m=53^{\circ}\text{C}$ ，elongation time 30 秒，共進行 25 回合。cDNA template 1  $\mu\text{L}$ ，10 mM 5' primer 1  $\mu\text{L}$ ，10 mM 3' primer 1  $\mu\text{L}$ ，2X taq Ready Mix+Dye 10  $\mu\text{L}$ ，ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ ，Total volume 20  $\mu\text{L}$ 。
2. 以 1% TAE agarose gel 電泳分析後，確認各樣本 internal control gene 條帶亮度相同。若不相同，則調整 cDNA 的量並重複步驟 1.。
3. 以目標基因上的引子，重複並使用調整過的 cDNA 比例，進行步驟 1.。依基因表現量進行決定回合數。比較不同樣本在同回合數反應後，電泳分析後的亮度及得知相對的基因表現強弱。

### 2.3.2 以即時聚合酶連鎖反應 (Real time PCR, q-PCR) 鑑定目標基因表現量

本實驗使用 KAPA<sup>TM</sup> SYBR FAST qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS)。此部分實驗藥品若套組中有提供，則均使用套組中提供的。

- 
1. 事先在 KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix (2X) Universal 中加入 40  $\mu$ L ROX Low，震盪均勻。
  2. 加入以下試劑至 real-time PCR 專用試管並額外調配一組樣品，但加入 internal control primer：步驟 1. 之 ready-mix 10  $\mu$ L，10 mM 5' primer 0.4  $\mu$ L，10 mM 3' primer 0.4  $\mu$ L，2.3.1 定量出之 cDNA，濾菌 milli-Q water 補至 20  $\mu$ L。
  3. 設定 real-time PCR 反應條件進行反應。

#### 第四節 製備雙重扣減式 cDNA 基因庫

本實驗採用 PCR-select<sup>TM</sup> cDNA subtraction kit (CLONCETH, K-1804-1)，此部分實驗藥品若套組中有提供，則均使用套組中提供的；製備流程原理見附錄圖一。

##### 2.4.1 合成第一股 cDNA

1. 取未共生之小白菜 (5 天大、7 天大、10 天大，混合取樣)，未共生之液態 KF 培養基培養 7 天之 *P. indica* 菌絲、感染後 2 天大、4 天大、7 天小白菜菌根組織及 control (套組中附的對照組) 的 Poly A<sup>+</sup> RNA 與下列物質於 0.5 mL 離心管中混合。

Poly A <sup>+</sup> RNA (2 $\mu$ g)	4 $\mu$ l
cDNA synthesis primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l

2. 於乾熱機中加熱至 70 ° C，2 分鐘。
3. 冰上 2 分鐘。
4. 用桌上型低速離心機離心 1 秒。
5. 每管分別加入下列物質。





5X first-strand buffer	2 $\mu$ l
dNTP mix (10 mM each)	1 $\mu$ l
Sterile H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l
DTT (20 mM)	1 $\mu$ l
SMATScript reverse transcriptase (100 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ l

6. 震盪混勻，用桌上型低速離心機離心 1 秒。
7. 於 PCR 機器加熱至 42° C，1.5 小時。
8. 置於冰上，馬上接著進行方法 2.4.2。

#### 2.4.2 合成第二股 cDNA

1. 將下列物質加入已合成的第一股 cDNA 管中(內含 10  $\mu$ L)。

Sterile H <sub>2</sub> O	48.4 $\mu$ l
5X buffer	16.0 $\mu$ l
dNTP mix ( 10 mM each )	1.6 $\mu$ l
20X second-strand enzyme cocktail	4.0 $\mu$ l

2. 16° C，2 小時(水浴或乾熱器)。
3. 加 2  $\mu$ L (6 units) T4 DNA polymerase。
4. 16° C，30 分鐘(水浴或乾熱器)。
5. 加 4  $\mu$ L 20X EDTA/glycogen。
6. 加 100  $\mu$ L phenol : chloroform : isoamyl alcohol ( 25 : 24 : 1 )。
7. 震盪混勻，室溫離心，14000 rpm，10 分鐘。
8. 取上清液另置新的 0.5 mL 離心管。



9. 加 100  $\mu\text{L}$  chloroform : isoamyl alcohol ( 24 : 1 ) 。
10. 重複步驟 7. 與 8. 。
11. 加 40  $\mu\text{L}$  4 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  與 300  $\mu\text{L}$  95%酒精 。
12. 震盪混勻，室溫離心，14000 rpm，20 分鐘 。
13. 倒掉上清液 。
14. 加 500  $\mu\text{L}$  80%酒精 。
15. 室溫離，14000 rpm，10 分鐘 。
16. 乾燥沉澱物除去剩餘的酒精 。
17. 溶於 50  $\mu\text{L}$  水中 。

#### 2.4.3 限制內切酶 RsaI 反應

1. 將下列物質加入 0.5 mL 離心管：

dscDNA	43.5 $\mu\text{l}$
10X Rsa I reaction buffer	5 $\mu\text{l}$
Rsa (10 units/ $\mu\text{L}$ )	1.5 $\mu\text{l}$

2. 37 $^{\circ}$  C，1.5 小時 。
3. 取出 5  $\mu\text{L}$  反應液，用以檢驗 RsaI 反應效率 。
4. 加 2.5  $\mu\text{L}$  20X EDTA/glycogen 。
5. 加 50  $\mu\text{L}$  phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)，震盪 10 秒 。
6. 室溫離心，14000 rpm，10 分鐘 。
7. 取出上清液，另置於乾淨的 0.5 mL 離心管 。
8. 加 50  $\mu\text{L}$  chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)，震盪 10 秒混勻 。
9. 重複步驟 6.及 7. 。



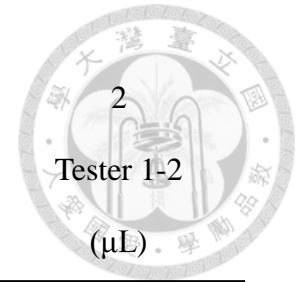
10. 加 25  $\mu\text{L}$  4 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  及 187.5  $\mu\text{L}$  95% ethanol。
11. 室溫離心，14000 rpm，20 分鐘。
12. 小心倒掉上清液。
13. 加 200  $\mu\text{L}$  80% ethanol。
14. 室溫離心，14000 rpm，5 分鐘。
15. 重複步驟 12.。
16. 真空乾燥沉澱物 5-10 分鐘。
17. 溶於 5.5  $\mu\text{L}$  水中。

#### 2.4.4 轉接子黏合反應

1. 製備 experimental tester cDNA：在感染後 2 天大、4 天大、7 天小白菜菌根組織之組別分別取 1  $\mu\text{L}$  Rsa I-digested experimental cDNA (方法 2.4.3 步驟 17.) 加 5  $\mu\text{L}$  無菌水稀釋。
2. 製備 control skeletal muscle tester cDNA
  - a. 取 2  $\mu\text{L}$  control DNA 加 38  $\mu\text{L}$  無菌水稀釋。
  - b. 取 1  $\mu\text{L}$  control skeletal muscle cDNA (2.4.3 步驟 17.) 與 5  $\mu\text{L}$  步驟 a. 中稀釋過的 control DNA 混合。
3. 製備黏合用 master mix (準備份數=實際需要份數+1)

	<u>per rxn</u>
Sterile $\text{H}_2\text{O}$	3 $\mu\text{L}$
5X ligation buffer	2 $\mu\text{L}$
T4 DNA ligase (400 units/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$

4. 製備 Adaptor-ligated tester cDNAs：將上述製備的 experimental tester cDNA 與按照下表指示加入 0.5 mL 離心管中

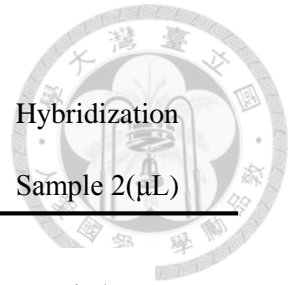


Component	Tube# :	1	2
		Tester 1-1 ( $\mu\text{L}$ )	Tester 1-2 ( $\mu\text{L}$ )
Diluted tester cDNA		2	2
Adaptor 1 (10 $\mu\text{M}$ )		2	-
Adaptor 2R (10 $\mu\text{M}$ )		-	2
Master mix		6	6
Final volume		10	10

5. 製備 Unsubtracted tester controls : 製備 Unsubtracted tester control 1-C 方法如下，自 Tester1-1 及 Tester1-2 中各取 2  $\mu\text{L}$  混合。(依此類推，製備其他組反應的 Unsubtracted tester controls)。
6. 取步驟 4. 及 5. 管子於 16° C 隔夜。
7. 加 1  $\mu\text{L}$  EDTA/glycogen。
8. 72° C，5 分鐘。

#### 2.4.5 第一回雜合反應

1. 將各個 experimental 及 skeletal muscle subtractions 按下表混合於 0.5 mL 離心管中，未共生之小白菜、未共生之 *P. indica* 之 experimental subtractions 各取 3  $\mu\text{L}$  混合成為 driver cDNA



Component	Hybridization	Hybridization Sample 2( $\mu\text{L}$ )
<i>Rsa</i> I-digested driver cDNA (2.4.3 步驟 17)	1.5	1.5
Adaptor 1-ligated tester 1-1 (2.4.4 步驟 8)	-	1.5
Adaptor 2R-ligated tester 1-2	1.5	-
4X hybridization buffer (!)	1.0	1.0
Final volume	4.0	4.0

!4X hybridization buffer 使用前置於室溫中 15~20 分鐘，確定無任何沉澱物方可使用。若有沉澱物請於 37° C 加熱約 10 分鐘至沉澱物完全溶解。

2. 於各管中加一滴礦物油。
3. 98° C ，1.5 分鐘。
4. 68° C ，8 小時，馬上進行第二回雜合反應。

#### 2.4.6 第二回雜合反應

1. 將下列物質混合於一管中

Driver cDNA	1 $\mu\text{L}$
4X hybridization buffer	1 $\mu\text{L}$
Sterile H <sub>2</sub> O	2 $\mu\text{L}$

2. 於步驟 1. 中取出 1  $\mu\text{L}$  置於 0.5 mL 離心管中，並加一滴礦物油。
3. 98° C ，1.5 分鐘。



4. 製備第二回雜合反應液：
  - a. 將微量吸管轉至刻度 15  $\mu\text{L}$ 。
  - b. 將吸管尖端插至 hybridization sample 2 的礦物油/水層分界面。
  - c. 吸取水層溶液(不需在意是否吸入些許的礦物油)。
  - d. 將吸管頭提離溶液，並吸入些許的空氣。
  - e. 重複步驟 b. - d. 將步驟 3.溶液吸入同一吸管。
  - f. 將吸管内溶液注入 hybridization sample1 管中。
  - g. 利用微量吸管吸排數次混合溶液。(除了操作必要外，勿讓 hybridization sample 離開乾熱器過久)。
5. 68 $^{\circ}\text{C}$ ，隔夜。
6. 加 200  $\mu\text{L}$  dilution buffer。
7. 68 $^{\circ}\text{C}$ ，7 分鐘。
8. 保存於-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 2.4.7 聚合酶連鎖反應

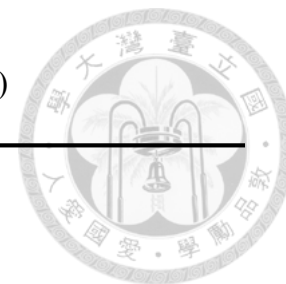
1. 製備聚合酶連鎖反應模版
  - a. 從各管 diluted cDNA (方法 2.4.6 步驟 8. 的 subtracted samples 及方法 2.4.4 步驟 5. 的 Unsubtracted tester controls) 取 1  $\mu\text{L}$  至 0.2 mL PCR 試管
  - b. 從 PCR Control subtracted cDNA 取由 1  $\mu\text{L}$  至 0.2 mL PCR 試管
2. 製備 master mix (準備份數=實際需要份數+1)



Reagent	per rxn ( $\mu\text{L}$ )
Sterile H <sub>2</sub> O	19.5
10X PCR reaction buffer	2.5
dNTP mix (10 mM)	0.5
PCR primer	1.0
50X advantage cDNA polymerase mix	0.5
Total volume	24.0

3. 步驟 1. 中各管各加入 24  $\mu\text{L}$  master mix。
4. 加 50  $\mu\text{L}$  礦物油。
5. 75° C 5 分鐘。
6. 聚合酶連鎖反應條件如下：
  - 94° C 25 秒
- 27 cycles
  - 94° C 10 秒
  - 66° C 30 秒
  - 72° C 1.5 分鐘
7. 取出 8  $\mu\text{L}$  於 2% 洋菜膠電泳分析。
8. 取 3  $\mu\text{L}$  primary PCR mixture 加 27  $\mu\text{L}$  水稀釋。
9. 從稀釋過的 primary PCR mixture 取 1  $\mu\text{L}$  至 0.2 mL PCR 試管。
10. 製備 master mix (準備份數=實際需要份數+1)

Reagent	per rxn ( $\mu\text{L}$ )
Sterile H <sub>2</sub> O	18.5
10X PCR reaction buffer	2.5
dNTP mix (10 mM)	0.5
Nested PCR primer 1 (10 $\mu\text{M}$ )	1.0
Nested PCR primer 2R (10 $\mu\text{M}$ )	1.0
50X Advantage cDNA polymerase mix	0.5
Total volume	24.0



11. 步驟 9. 中各管各加入 24  $\mu\text{L}$  1 master mix 。

12. 加一滴礦物油 。

13. 聚合酶連鎖反應條件如下：

- 94 ° C 10 秒
- 68 ° C 30 秒
- 72 ° C 1.5 分鐘

10-12 cycles

14. 取 8  $\mu\text{L}$  於 2% 洋菜膠電泳分析 。

15. 保存於 -20 ° C 。

16. 樣品即為菌根組織在不同時間點特異表現之雙重扣減式 cDNA 基因庫，後交由源資國際生物科技股份有限公司進行定序與初步分析 。





## 第五節 生物資訊分析方法

### 2.5.1 雙重扣減式 cDNA 基因庫分析

1. 從源資公司定序服務中定序序列拼湊出來的 contigs 中挑選，選出 NCBI blastn 服務 annotation 屬於 *P. indica* 的基因與未有吻合物種之基因。
2. 將步驟 1. 挑選的結果到 Joint Genome Institute (<http://jgi.doe.gov/>) 中真菌基因組資料庫 The Fungal Genomic Resource (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) 所提供的 *P. indica* 的資料庫所提供的 blastx 服務進行分析，挑選 alignment hit score>80，E-value<E-020，%identity>80%的分析結果視為 *P. indica* 於共生階段特異表現之基因。
3. 將步驟 2. 挑選的結果再次於 *P. indica* 的資料庫查詢，挑選出基因產物預測具有 signal sequence、但不屬於 transmembrane domain 的基因做為候選基因。

### 2.5.2 *P. indica* 基因體分析

1. 由 Joint Genome Institute 中所提供的真菌基因組資料庫 The Fungal Genomic Resource 獲取 *P. indica* 完整的基因體序列 (Zuccaro et al., 2011)。
2. 使用資料庫 The European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>) (Li et al., 2015) 中 sequence translator 的服務將 *P. indica* 基因體序列全數轉譯為蛋白質序列，並且將基因產物蛋白質序列少於 300 個胺基酸的基因產物挑出。
3. 使用平台 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen et al., 2011) 的服務將步驟 2. 中挑出的基因產物進行預測，挑選出帶有 signal sequence 的基因產物。
4. 使用平台 subcellular localization predictor (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu et



al., 2004) 的服務將步驟 3. 中挑選出的基因產物進行 subcellular localization 的預測，挑選出可能同時分泌在細胞外與坐落在細胞核的基因產物。

5. 分別在平台 Balanced Subcellular Localization Predictor (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello/index.htm>) (Pierleoni et al., 2006)與 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) (Chou et al., 2008) 上預測步驟 4. 中預測出的基因產物在真菌細胞與植物細胞中可能的 subcellular localization，挑選出在真菌細胞中預測為分泌蛋白的產物，並且同時在植物細胞中預測入核的基因產物。
6. 使用 Center for National Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中資料庫 Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 所提供的 GEO2R 服務分析編號 GSE47775 與 GSE31266 的資料。比較於步驟 5. 中挑選出之基因在阿拉伯芥或大麥中與 *P.indica* 共生前後的基因表現量，並且挑選出有因為共生而使表現量上升的基因作為候選基因。

## 第六節 阿拉伯芥葉肉原生質體之分離與轉形

阿拉伯芥葉肉原生質體 (mesophyll protoplast) 之分離與轉形主要依據 Yoo 等人之方法加以修改後進行(Yoo et al., 2007)。

1. 取生長於短日照 (8 小時光照，16 小時黑暗)6 個星期之阿拉伯芥，以刀片切碎葉片並鋪滿培養皿，加入 Enzyme solution (cellulase R10 (1.5%)，macerozyme R10 (0.3%)，mannitol (0.4 M)，KCl (20 mM)，20 mM MES (pH5.7)，CaCl<sub>2</sub> (10 mM)，BSA (bovine serum albumin) (0.1%)) 在室溫下 50 g 低速搖晃 3 個小時以上。



2. 以濾網過濾殘渣，室溫 100 g 低速離心兩分鐘，並除去上清液。
3. 加入 W5 buffer (155 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 2 mM MES (pH5.7), 5 mM glucose), 重新懸浮原生質體。
4. 室溫 100 g 低速離心兩分鐘，並除去上清液
5. 重複以 W5 buffer 清洗數次後，最後將原生質體放置於 W5 buffer 中靜置 30 分鐘。
6. 以 MMg solution (400 mM mannitol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM MES (pH5.7)) 回溶，使原生質體細胞膜通透性增加，利用血球計數計算細胞數為 80-120x10<sup>4</sup> cell/mL。
7. 加入 5-10 μg 構築好之質粒 (plasmid)。100 μL 溶於 MMg 之原生質體以及等體積之 PEG solution (PEG4000 (40%)), 200 mM mannitol, 100 mM CaCl<sub>2</sub>), 混勻後靜置 5 分鐘，加入 W5 buffer 清洗。
8. 低速離心除去上清液後，以 W5 buffer 回溶，室溫照光 16-18 小時後進行原生質體短暫性分析。

## 第七節 阿拉伯芥原生質體細胞次定位分析 (subcellular localization)

### 2.7.1 次細胞定位載體構築

本實驗使用 pCRTM8<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kits (Invitrogen) 和 Gateway<sup>®</sup> LR Clonase<sup>®</sup> II Enzyme mix (Invitrogen) 進行實驗。設計引子、並以共生狀態的 *P. indica* cDNA 做為模版，以 PCR 將 *PIIN\_05990*、*PIIN\_09643*、*PIIN\_11103* 基因去掉中止子之開放閱讀框 (open reading frame, ORF) 全長增幅，接入 PCR8/GW/TOPO 載體，並定序確認接入片段無誤。透過 gateway system 利用 PCR8/GW/TOPO 載體上之 attL1 和 attL2 與含有綠色螢光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的 p2GWF7 載體上之 attR1、attR2 進行序列互換原理，完成以 35S 啟動子啟動 *PIIN\_05990*-EGFP、*PIIN\_09643*-EGFP 和 *PIIN\_11103*-EGFP 融合蛋

白之載體構築 (附錄圖二) 。抽取大量質粒後 (Plasmid Midi prep Purification Kit, GeneMark) 進行次細胞定位分析。



### 2.7.2 阿拉伯芥原生質體轉形與影像分析

利用分離完成之阿拉伯芥原生質體 (參照方法 2.6 阿拉伯芥葉肉原生質體分離與轉形) , 加入 10  $\mu$ g 已構築好目標基因接上綠色螢光蛋白之質粒 (載體構造參照方法 2.7.1 次細胞定位載體構築) 轉入原生質體中。室溫照光 16~18 小時後, 使用共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5, Zeiss LSM 780) 偵測相關螢光訊號, 包含目標基因(綠色螢光蛋白: GFP) 。細胞核標定 (利用 mCherry-NLS 質粒共同轉入於原生質體中, 於共軛焦顯微鏡觀察時加入) 和葉綠體自體螢光進行細胞定位分析之攝影。

## 第八節 以農根菌 A4 品系產生小白菜轉殖毛狀根

### 2.8.1 轉殖毛狀根系使用載體構築

同方法 2.7.1, 透過 gateway system 利用 PCR8/GW/TOPO 載體上之 attL1 和 attL2 與 pEarleyGate101 上之 GATEWAY 序列進行序列互換原理 (Earley, 2006) , 完成以 35S 啟動子啟動 PIIN\_05990-EYFP、PIIN\_09643-EYFP 和 PIIN\_11103-EYFP 融合蛋白之載體構築 (附錄圖三) 。

### 2.8.2 轉殖毛狀根系之建立與鑑定

1. 以 YEB (beef extract (5 g/L) 、yeast extract (1 g/L) 、peptone (5 g/L) 、sucrose (5 g/L) 、MgCl<sub>2</sub> (0.5 g/L) ) 培養基培養小量農根菌 A4 品系 5 mL, 28 ° C 震盪培養兩天。
2. 將菌液放大培養至 20 mL, 加入 0.4 mM acetosyningone 誘導活性, 28 ° C 震盪培養隔夜。



3. 將菌液以 3,600 rpm，10 分鐘，4° C 離心。
4. 倒去上清液，加入 20 mL 1/2MS 液態培養基回溶菌體。
5. 將菌液以 3,600 rpm，10 分鐘，4° C 離心。
6. 倒去上清液，加入 3 mL 1/2MS 與 0.4 mM acetosyringone 回溶菌體，使菌液中濃度至少達到 OD600=0.6 或以上。
7. 取 300  $\mu$ L 菌液以玻棒均勻塗抹在 1/2MS 固態培養基上。
8. 取 3 天大小白菜，以刀片分離植株上下胚軸，取上胚軸部分備用。
9. 將刀片浸潤菌液後切除上胚軸至子葉基部。
10. 將子葉基部貼附於帶菌液的 1/2MS 固態培養基上，25° C 閉光培養三天。
11. 照光培養兩天。
12. 選擇產生毛狀根系的植株以滅菌水洗滌、瀝乾。重複三次。
13. 以 1/2MS 液態培養基洗滌、瀝乾。重複三次。
14. 將植株移到添加抗生素 (timetin (200 ppm) 、cefotaxime (200 ppm) ) 之 1/2MS 固態培養基培養一週以殺除農根菌。
15. 挑選單一條毛狀根繼代到新的添加抗生素 (timetin (200 ppm) 、cefotaxime (200 ppm) ) 之 1/2MS 固態培養基放大，以 RT-PCR 與 western blot 確認為轉殖根後作為實驗材料。

全流程示意圖見附錄圖四

### 第九節 真菌共生量測定

1. 取用每盤四條 2-3 公分長之轉殖根平均繼代於新培養基的四個角落，並且在根長中段接種 *P. indica* (示意圖見附錄圖五)。
2. 取用接種處周圍 2.5 公分的共生組織作為樣本，總重量 0.1 g。
3. 採用方法 2.12.1 進行實驗，取用步驟 5. 之 DNgone column。
4. 採用 GenepHlow™ Gel/PCR Plus kit (Geneaid, DFH300) 進行清洗。



5. 加入 400  $\mu$ L W1 buffer，室溫離心 15 秒，13000 rpm。
6. 加入 600  $\mu$ L wash buffer，室溫離心 15 秒，13000 rpm。
7. 以室溫離心 3 分鐘，13000 rpm。
8. 取 30  $\mu$ L，預熱至 70° C 的無菌水，點在膜上回溶 2 分鐘。
9. 室溫離心 2 分鐘，13000 rpm。
10. 跑膠與測量 OD 值確認質量以後保存於-80° C，後續實驗使用。
11. 取用 600 ng 之 DNA 作為模板，*Actin/PiTEF1 $\alpha$*  之 primer，以方法 2.3 進行植物與真菌基因體比例的量化分析，做為共生量指標。

#### 第十節 純化候選基因之重組蛋白

本實驗誘導大腸桿菌 codon 品系大量表現構築於 pMALc5X 上之帶有蛋白酶 factor-XA 切位的半乳糖結合蛋白 (Maltose binding protein, MBP) 候選基因重組蛋白，隨後進行純化。並且以 factor-XA 切除 MBP tag。

1. 小量培養菌液 2 ml，37° C 震盪培養過夜。
  2. 放大培養菌液至 200 ml，37° C 震盪培養至 OD<sub>600</sub>=0.5~0.7。
  3. 加入 IPTG(終濃度=0.1 mM) 誘導，28° C 震盪培養 4 小時或 8 小時。
  4. 將菌液倒入高速離心瓶中，以 4° C 離心，12000 rpm，10 分鐘。倒去上清液，以 20 ml 事先預冷的 column buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.4)，200 mM NaCl，1 mM EDTA) 回溶菌體。
  5. 將菌液轉移至 50 ml 離心管，以 4° C 離心，12000 rpm，10 分鐘。
  6. 倒去上清液，將菌體以液態氮急速冷凍。
- ※步驟 3-6 全程在冰上操作
7. 將菌體以 12 ml column buffer 回溶，並且加入 PMSF 蛋白酶抑制劑(終濃度 1 mM，stock 溶於 DMSO)防止蛋白降解，並轉移至兩個 10 ml 魚雷管



- 中。
8. 超音波破菌，sonicator 設定為 1 eV，每作用 30 秒休息 30 秒，作用約 5~10 分鐘至菌液呈現無沉澱澄清狀液體。
  9. 將菌液轉移到 15 ml 離心管以 4° C 離心，12000 rpm，10 分鐘。
  10. 將上清液以 0.45 μm 孔徑 filter 過濾，轉移到乾淨的 15 ml 離心管
  11. 準備含有 1 ml amylose resin 的 column，以一個 column 體積的 column buffer 通過 column 後蓋下蓋，預備。
  12. 將 5 ml 步驟 4. 上清液轉移入內，封好上蓋後，以 10 rpm，2 小時，4° C 將 resin 均勻搖起震盪。剩餘上清液保留為 input 跑膠。
  13. 打開 column 的上下蓋使液體自然流出，收集 1ml 為 flow through 1 跑膠。
  14. 蓋下蓋，加入一個 column 體積的 column buffer，以 10 rpm，5 分鐘，4° C 將 resin 均勻搖起震盪後流掉 column buffer。
  15. 重複步驟 14. 。
  16. 蓋下蓋，加入 2 ml elution buffer (10 mM maltose 之 column buffer) ，以 10 rpm，5 分鐘，4° C 將 resin 均勻搖起震盪。
  17. 打開 column 的上下蓋使液體自然流出，收集蛋白。
  18. 加入 digestion buffer digestion buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0) ，100 mM NaCl，2 mM CaCl<sub>2</sub>，factor XA 3 μg/ml) ，以 10 rpm，4° C 均勻震盪隔夜。產物測定濃度與跑 SDS 膠確定品質後可供後續實驗使用。

※全程在冰浴上及冷房中操作

### 第十一節 純化蛋白處理

1. 取用約一個月大之小白菜健康的葉子，由葉柄剪下葉子
2. 葉柄插入 3.4 μM 經過 factor-XA 處理過後的純化蛋白 (溶於 1/2MS 液態

培養基)，室溫照光培養 2.5 小時，收取樣本或處理病原菌。

3. 將 10  $\mu\text{L}$  病原點在葉脈兩側，將樣本放在沾濕的擦手紙上，放入潮濕透光的容器中以保鮮膜封好，室溫照光培養隔夜後觀察樣本呈炭疽狀的感病情形。

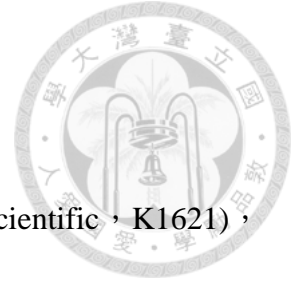
## 第十二節 其他基本實驗技術

### 2.12.1 萃取總體 RNA：

採用 LapPrep™ RNA Plus kit (LABTURBO, LPRS100)，此部分實驗藥品若套組中有提供，則均使用套組中提供的。

1. 取 4.5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -Mercaptoethanol 加入 450  $\mu\text{L}$  TRLL buffer 震盪均勻。
2. 取 0.1 g 組織於 1.5 mL 離心管中，加入液態氮後以小研磨棒磨碎。
3. 加入 450  $\mu\text{L}$  TRLL buffer，回溶後震盪均勻。
4. 室溫離心 2 分鐘，13000 rpm。
5. 將上清液轉移至 DNgone column，室溫離心 2 分鐘，13000 rpm。
6. 將下清液轉移至 2 mL 離心管，加入 1/2 體積的純酒精，震盪均勻。
7. 將步驟 6. 轉移至 RNA Spin column，室溫離心 15 秒，13000 rpm。(若步驟 6. 總體積超過 600  $\mu\text{L}$ ，重複操作步驟 7. 分批離心)
8. 加入 650  $\mu\text{L}$  TRW1 buffer，室溫離心 15 秒，13000 rpm。
9. 加入 600  $\mu\text{L}$  TRW2 buffer，室溫離心 15 秒，13000 rpm。
10. 重複操作步驟 9.
11. 室溫離心 3 分鐘，13000 rpm。
12. 取 50  $\mu\text{L}$ ，預熱至 70° C 的 CCEB buffer，點在 RNA Spin column 的膜上回溶 1 分鐘。
13. 室溫離心 1 分鐘，13000 rpm。
14. 保存於 -80° C，後續實驗使用。





### 2.12.2 合成第一股 cDNA

使用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, K1621), 部分實驗藥品若套組中有提供, 則均使用套組中提供的

1. 取 2.5 mg RNA 加入 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 調整體積至 5.5 μL 。
2. 加入 0.5 μL oligo dT18 primer 以 65 ° C 加熱 5 分鐘移至冰上 10 分鐘。
3. 加入 2 μL 5X Reaction buffer、1 μL 10 mM dNTP mix、1 μL Ribolock™ RNase inhibitor 及 1 μL RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase 。
4. 於 42 ° C 反應一小時。
5. 於 72 ° C 停留五分鐘, 終止反應作用視產物濃度決定稀釋倍數, 之後可進行 PCR 分析或保存於 -80 ° C 。

### 2.12.3 農根菌勝任細胞 (competent cell)的製備

1. 將農根菌 A4 於 YEB 液體培養基中 28 ° C 小量震盪培養隔夜。
2. 將菌液加入 100 mL YEB 液體培養基中 28 ° C 震盪培養至 OD<sub>600</sub>= 0.8
3. 室溫離心, 3600 rpm, 5 分鐘, 去上清液。
4. 用預冷之 100 mL 無菌水懸浮菌體。
5. 室溫離心, 3600 rpm, 5 分鐘, 去上清液。
6. 用預冷之 50 mL 無菌水懸浮菌體。
7. 室溫離心, 3600 rpm, 5 分鐘, 去上清液。
8. 用預冷之 10 mL 無菌水懸浮菌體。
9. 室溫離心, 3600 rpm, 5 分鐘, 去上清液。
10. 用 2 mL 預冷之 10% glycerol 重新懸浮菌體。
11. 將菌液以每管 0.05 mL 分裝至微量離心管中, 以液態氮急速冷凍, 保存於 -80 ° C 中備用。

※全程操作與器具在冰上操作



#### 2.12.4 農根菌勝任細胞之轉型(transformation)

1. 事先將電擊管置於烘箱乾燥。
2. 將 3-5  $\mu\text{L}$  欲轉型之質體加入 A4 勝任細胞管中，靜置於冰上 5 分鐘。
3. 電擊管取出置於冰上預冷。吸取步驟 2. 之混合液並加至電擊管中蓋上蓋子。使用電穿孔儀器 (MicroPulser<sup>TM</sup>, BioRad) 進行電擊。
4. 加入 900  $\mu\text{L}$  YEB 液體培養基於電擊管中，輕輕混勻。取出混合液加至新的 1.5 mL 離心管中，於 28°C 震盪培養至少一小時。
5. 菌液常溫離心，13000 rpm，1 分鐘。
6. 去上清液，加入 150  $\mu\text{L}$  YEB 液態培養基回溶菌體，塗於 YEB 固體培養基 (含抗生素)，於 28°C 培養兩天。
7. 挑選出生長的菌落以 PCR 確認目標基因以轉殖入農根菌。

## 第三章 結果




### 第一節 *P. indica* 效應蛋白候選基因之篩選

#### 3.1.1 *P. indica* 效應蛋白候選基因之初步篩選


本研究中，*P. indica* 效應蛋白候選基因之來源有三：其一來自前人研究 *P. indica* 與植物交互作用的文獻。德國的 Kogal 團隊藉由 yeast secret sequence trap (YSST) 的系統篩選出 *P. indica* 接觸植物細胞壁萃取物後所誘導表現的分泌蛋白，並且進一步在阿拉伯芥葉片上皮細胞與轉殖株上探討這些分泌蛋白是否具有效應蛋白的功能 (Klute, 2011)。本研究從中挑選出 *PIIN\_07104*、*PIIN\_04526* 與 *PIIN\_02169* 做為候選基因。此外，本實驗室過去的研究中，為了研究小白菜感染 *P. indica* 後與益生效益相關的特異表現基因，建立了小白菜感染 *P. indica* 後的雙重扣減式表現序列標籤資料庫 (Double subtractive expressed sequence tag library, EST library) (Lee et al., 2011)。由於無法將 *P. indica* 因共生後特異表現的 cDNA 序列扣減，故本資料庫亦可做為挑選可能之候選效應蛋白基因之來源。本研究從中挑選出 *PIIN\_02699* 做為候選基因。

其二為雙重扣減式 cDNA 基因庫。為了篩選 *P. indica* 因為共生而差異表現的基因。我們以 *P. indica* 感染發芽三天後的小白菜，並且根據 Jacobs 等人的研究 (Jacobs et al., 2011) 定義感染以後 2、4、7 天代表共生過程中早期、中期與晚期之樣本，因此收集被 *P. indica* 感染 2、4、7 天之小白菜根系製作 tester cDNA。並且以未感染的小白菜根組織、液態培養 7 天之 *P. indica* 菌絲製作 driver cDNA 進行扣減 (方法參照第二章第四節)。最後建構出 *P. indica* 與小白菜共生後的雙重扣減式 cDNA 資料庫，反應產物為 *P. indica* 與植物因為共生後差異表現之 cDNA 片段 (表一)。之後由生技公司做進行 high-throughput sequencing 與 blastn 的分析 (e-value < 10<sup>-5</sup>) (方法參照第二章第五節 2.5.1)。結果 *P. indica* 感染 2、4、7 天之小白菜根系 (2 dai、4 dai、7 dai) 之扣減式 cDNA



基因庫中的序列定序後經過重組分別能產生 216、4124、3750 個 contigs (表一)。而經過 *P. indica* 基因體與 NCBI 資料庫進行 blastn 的比對後，2 dai 中發現 216 個 hit，0 個 hit 屬於 *P. indica*，4 dai 中發現 649 個 hit，5 個 hit 屬於 *P. indica*，7 dai 中發現 584 個 hit，15 個 hit 屬於 *P. indica* (表一)，然而其中並沒有發現可能是效應蛋白基因的候選。因此我們在 *P. indica* 基因體資料庫中將 unhit 的序列進行 blastx 的分析，將 Hit identity%>50%，hit coverage%>20% 並且  $e\text{-value} < 10^{-20}$  的序列視為屬於 *P. indica* 的特異表現基因，並在 NCBI 資料庫進行 blastx 分析，確定序列並非植物基因序列 (方法參照第二章第五節 2.5.1)。結果由 4 dai 中發現 contig3741 屬於 *P. indica* 基因 *PIIN\_05767* 的序列，7 dai 中發現 3530、2957 與 3453 屬於 *P. indica* 基因 *PIIN\_03013*、*PIIN\_03688* 與 *PIIN\_05990* 的序列 (表一)。然而 *PIIN\_03688* 的基因產物大小超過 1000 個胺基酸，且不具有訊息胜肽，較不可能是效應蛋白。因此僅挑選 *PIIN\_03013*、*PIIN\_05767* 與 *PIIN\_05990* 為候選基因。

其三則使用生物資訊方法分析 *P. indica* 基因組，尋找可能為效應蛋白的候選基因。由於 *P. indica* 共生時特異表現的基因並不限於效應蛋白基因，效應蛋白基因的誘導表現量可能不及其他共生所需的基因，如：代謝相關生理的基因。因此，只從 cDNA 基因庫中特異表現量大的序列做為挑選來源，很可能將許多不是效應蛋白的基因納為候選。因此，有鑑於目前所發現的效應蛋白大多屬於小型分泌蛋白，我們亦將 *P. indica* 基因組中全數的基因依據基因產物之大小與分泌性進行篩選 (方法參照第二章第五節 2.5.2)，希望可以從基因產物為小型分泌蛋白的基因找到適當的候選。分析結果中，*P. indica* 基因體中共有 11767 個基因，基因產物大小在三百個胺基酸以下的基因有 4917 個，而其中含有訊息胜肽序列的有 416 個。經過 CELLO 的分析這 416 個基因產物，有 264 個屬於可能會分泌到真核細胞外的小型分泌蛋白，其中有 37 個同時有可能出現在細胞核，8 個同時有可能出現在細胞質，4 個同時有可能出現在葉




綠體中 (圖一)。可能出現在細胞核的 37 個基因產物以 BaCelLo 與 Cell-PLoc 提供之線上服務進行分析，有 10 個基因產物預測被送出真菌細胞外，但是有可能進入植物細胞中的核，分別為 PIIN\_09895、PIIN\_05932、PIIN\_10451、PIIN\_10147、PIIN\_08870、PIIN\_05865、PIIN\_09643、PIIN\_05098、PIIN\_06837 與 PIIN\_11103。其中六個和效應蛋白功能與轉錄調控相關，五個屬於 DELD 蛋白，七個在 Zuccaro 等人發表的微陣列數據 (GEO accession=GSE47775) 中能因為共生而誘導表現量 (Zuccaro et al., 2013)。由於我們希望找出 *P. indica* 廣泛做用於植物的效應蛋白，因此我們挑選 PIIN\_09643 與 PIIN\_11103 這兩個在單子葉植物 (大麥) 與雙子葉植物 (阿拉伯芥) 中都會因為共生而誘導表現量的基因為候選基因 (圖一)。

由這三個來源所挑選到的候選基因共有 9 個：PIIN\_07104、PIIN\_04526、PIIN\_02699、PIIN\_02169、PIIN\_05767、PIIN\_03013、PIIN\_05990、PIIN\_09643、PIIN\_11103。以上挑選出的候選基因之基因產物皆為五百個胺基酸以內的小型蛋白，並且除了 PIIN\_05990 以外皆具有信息胜肽。此外分別在 PIIN\_07104 上預測出 inhibitor I9 domain 與 peptidase S8 的相似區段；在 PIIN\_02699 上預測出 thioredoxin domain 與 Proteasome-Interacting Thioredoxin domain；PIIN\_02169 上預測出 LysM 的相似區段與 polysaccharide-deacetylase domain 的相似區段；PIIN\_03013 上預測出 Laminarinase 16A 的相似區段；PIIN\_09643 上預測出 BAF1 / ABF1 chromatin reorganizing factor 的相似區段 (圖二)。候選基因之序列資訊詳見第 92 頁到第 99 頁附錄。

### 3.1.2 候選基因與小白菜共生時之表現樣態 (expression pattern)

為了驗證候選基因是否在 *P. indica* 與小白菜共生的共生過程中發揮作用而被誘導表現，我們取用未感染之小白菜根組織、液態培養之 *P. indica* 菌絲、以 *P. indica* 感染發芽三天後的小白菜，經過感染後 2、4、7 天之小白菜根系做



為與 *P. indica* 共生時初期、中期與晚期階段的樣本，進行 RT-PCR。以檢測九個候選基因於共生階段的表現樣態。實驗結果說明，在這九個候選基因中僅有 *PIIN\_05990*、*PIIN\_09643*、*PIIN\_11103* 會因為與小白菜共生而被誘導表現量 (圖三)。並且以 q-PCR 重新確認與量化其結果 (圖四)。根據此結果，我們決定對這三個基因做進一步的探討。

### 3.1.3 候選基因於植物細胞中之次細胞定位 (subcellular localization)

基於目前所發現的效應蛋白大多屬於作用於植物細胞的小型分泌蛋白，本研究中對候選基因應用生物資訊學方法的篩選亦十分注重於候選基因產物的大小與植物中的次細胞定位。因此我們將 *PIIN\_05990*、*PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 於 C-terminal 接上綠螢光蛋白後轉入阿拉伯芥之原生質體，以共軛焦螢光顯微鏡觀察蛋白的次細胞定位，以驗證結果是否符合我們的預測。由結果對照可以確認，*PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 在植物細胞中的次細胞定位如生物資訊學方法的預測，位於細胞核中 (圖五 D、圖五 E)。而 *PIIN\_05990* 在植物細胞中的次細胞定位 (圖五 C) 則與 free GFP (圖五 B) 的分布一樣，同時分佈在細胞質與細胞核中，因此無法說明其在植物細胞中有特別的次細胞定位。


由於目前所發現到的兩個共生真菌效應蛋白，MiSSP7 與 SP7 都能進入植物的細胞核中發揮作用以促進真菌與植物的共生 (Kloppholz et al., 2011; Plett et al., 2011)。因此我們認為受共生誘導表現、並且能被運輸到植物細胞核的 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103*，可能如同與 MiSSP7 與 SP7 一般能影響植物的生理，並且在 *P. indica* 與植物的共生發揮作用。為此，接下來將繼續探討 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 在植物中的生理功能。

### 3.1.4 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 候選基因核苷酸序列與胺基酸序列特性分析

我們將候選基因 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 候選基因之核苷酸序列與胺基酸在 NCBI 資料庫中進行 blastn、blastp 與 blastx 的分析以後發現，這兩個候選基因皆為不存在於其他物種中的 novel gene，且彼此並不具有相似性。*PIIN\_09643* 為 354 個核苷酸長，轉譯出 118 個胺基酸的基因。其蛋白產物中，1~19 的胺基酸預測為訊息序列 (signal sequence)，35~108 的胺基酸預測為 BAF1 / ABF1 chromatin reorganizing factor 的相似區段，114~118 的胺基酸為 DELE motif (圖六 A)。而 *PIIN\_09643* 為 342 個核苷酸長，轉譯出 118 個胺基酸的基因。其蛋白產物中，1~18 的胺基酸預測為訊息序列 (signal sequence) (圖六 B)。

## 第二節 候選基因毛狀根系統 (hairy root system) 之建立與鑑定

根據過去種種研究及文獻，我們於本論文前言中推論：*P. indica* 共生於植物根部時，應該需要分泌效應蛋白影響植物的生理作用，以促進共生。為了快速分析候選基因的作用機制，我們建立小白菜的毛狀根系統，以便在基因層次上快速篩選植物可能受候選基因影響的生理功能。完成以 35S 啟動子驅動候選基因 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 的載體 (附錄圖二) 後 (方法參照第二章第八節 2.8.1)。藉由農根菌品系 A4 將候選基因快速、穩定的轉殖在小白菜的毛狀根，並且透過抗生素 timetin 與 cefotaxime 滅殺農根菌以後挑選單一條毛狀根為獨立轉殖系 (independent line) (方法參照第二章第八節 2.8.2，流程參照附錄圖三)。隨後，各挑十個空載體與候選基因獨立轉殖系進行繼代，以抽取 RNA 與蛋白質進行 RT-PCR、q-PCR 與 western blot 等實驗，進而挑選出基因與蛋白質層次上穩定表現的獨立轉殖系。由 RT-PCR 結果中確認，空載體 EV-2、EV-3、*PIIN\_09643 OE-5*、*PIIN\_09643 OE-8*、*PIIN\_11103 OE-2*、與 *PIIN\_11103 OE-4* 毛狀根系均表現載體 pEarleyGate101 中 BAR 基因，故皆為農根菌的 T-



DNA insertion line (圖七 A)。同時，*PIIN\_09643 OE-5*、*PIIN\_09643 OE-8*、*PIIN\_11103 OE-2*、與 *PIIN\_11103 OE-4* 毛狀根系均增幅出大小正確、專一的候選基因片段，因此說明的確有表現候選基因 (圖七 A)，這些結果也由 q-PCR 進行再次驗證 (圖七 B、圖七 C)。最後由 *PIIN\_09643 OE-5*、*PIIN\_09643 OE-8*、*PIIN\_11103 OE-2*、與 *PIIN\_11103 OE-4* 抽取 15 µg 蛋白質、以 anti-HA 為一級抗體辨認融合在候選基因上的 HA (virus haemagglutinin) tag 進行 western blot，確認有候選基因蛋白質的表現 (圖八)。因此接下來的實驗中將選取 *EV-3* 毛狀根系為 *EV control*、*PIIN\_09643 OE-5*、*PIIN\_09643 OE-8*、*PIIN\_11103 OE-2*、與 *PIIN\_11103 OE-4* 為候選基因毛狀根系進行後續實驗。


### 第三節 利用毛狀根系統探討候選基因於植物中可能的生理功能

由於各種效應蛋白的作用機制與所影響植物的生理途徑不盡相同。我們難以清楚預料候選基因的功能。參考 *MiSSP7* 與 *SP7* 的例子，我們假設 *P. indica* 的效應蛋白可能具有促進共生系統之建立或植物益生效益的功能。因此我們將 *EV control* 與各個候選基因毛狀根系於新的 1/2MS 培養基上繼代，於 25 °C 暗室中培養十天後收取新鮮樣本，並分為四個方面探索候選基因在植物體中可能的生理功能。

#### 3.3.1 生長素反應相關基因 (auxin related genes)

本實驗室先前的研究證實，*P. indica* 與小白菜的共生能藉由提高 *AUX1* 生長素運輸蛋白與其他生長素相關基因如 *expansin A17* 的表現，使小白菜根毛與根系的發育更為發達，並觀察到植株發育情況的改善 (Lee et al., 2011; Kao, 2013)，因此將使用 q-PCR 測定候選基因毛狀根系中 *AUX1*、*RHD4*、*V-type ATPase* 與 *expansin A17* 之基因表現量，以驗證候選基因是否與 *P. indica* 藉由提升生長素反應相關基因表現以促進植物根系發育的現象有關。





然而，除了在 *PIIN\_09643 OE-8* 中 *V-type ATPase* 的表現量較 *EV control* 相比有顯著的提升之外，在 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 的毛狀根系中 *AUX1*、*RHD4*、*V-type ATPase*、*expansin A17* 等生長素反應相關基因與 *EV control* 相比均沒有明顯提升或下降的趨勢（圖九）。因此我們認為 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 和 *P. indica* 藉由提升生長素反應相關基因促進植物根系發育的現象沒有明顯的關聯。


### 3.3.2 氧化還原狀態相關基因 (redox-status relative genes)

本實驗室先前的研究與其他調查文獻亦指出，*P. indica* 與小白菜的共生能藉由提高植物中 antioxidant recycling (附錄圖七) 相關基因如 glutathione-S transferase tau (*GSTU*)、*MDAR2* 與 *DHAR5* 等基因的表現量，進而使還原物質含量提升、超氧化物含量下降，因而減輕了逆境對植物的傷害 (Lee et al., 2011; Kao, 2013; Waller et al., 2005; Baltruschat et al., 2008; Sun et al., 2010)。因此將測定候選基因毛狀根系中 *GSTU*、*MDAR2* 與 *DHAR5* 之基因表現量，以驗證候選基因是否會影響氧化還原狀態相關基因之表現。

結果發現，*PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 的毛狀根系中，*MADR2* 與 *EV control* 相比均沒有明顯提升或下降的趨勢（圖十）。但是 *DHAR5* 方面，*PIIN\_09643* 毛狀根系中的表現量與 *EV control* 相比高約 3 倍，*PIIN\_11103* 毛狀根系中的表現量與 *EV control* 相比則高約 2.5 倍（圖十）。而 *GSTU* 表現量方面，過度表達候選基因也造成了影響。*PIIN\_09643* 毛狀根系中 *GSTU* 表現量與 *EV control* 相比高約有 2 倍，*PIIN\_11103* 毛狀根系中與 *EV control* 相比則高約 1.75 倍（圖十）。

### 3.3.3 植物 PTI 反應防禦相關指標基因 (PTI response defense related genes)

另外，效應蛋白常見的重要功能為壓制（或調節）植物的免疫反應以利於



微生物在植物體內的生長、生殖與傳播。因此，我們選擇了兩個重要的標誌基因 (marker gene) *PR1* 與 *PDF1.2* 做為植物 PTI 防禦反應中重要的 SA 路徑與 JA 路徑的指標，並且觀察候選基因是否會對此二植物防禦反應相關基因的表現量造成影響 (附錄圖八)。從 q-PCR 的結果中發現，*PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 的毛狀根系中 *PR1* 的表現量與 *EV control* 相比均被壓抑到 0.3~0.01 倍之低 (圖十一)。但在 *PDF1.2* 表現量方面，與 *EV control* 相比則沒有特別顯著的差異 (圖十一)。

### 3.3.4 *P. indica* 共生狀態下植物 PTI 反應相關指標基因

為了瞭解候選基因對於植物防禦基因的影響，在與 *P. indica* 實際與植物發生共生前後有合異同。因此取用 *EV control* 與各個候選基因毛狀根系各四條單一條根部進行繼代，於 25 °C 暗室中成長三天後接種 (方法參照第二章第九節，示意圖見附錄圖五)。並且在接種三天與七天後收取樣本，再對 *PR1* 與 *PDF1.2* 的表現量進行測量。結果發現，*P. indica* 接種三天後，*PIIN\_09643* 的毛狀根系中 *PR1* 的表現量與 *EV control* 相比均被壓抑到 0.2 倍以下 (圖十二 A)。而 *PIIN\_11103* 的毛狀根系中 *PR1* 的表現量與 *EV control* 相比也均被壓抑到 0.25~0.3 倍以下 (圖十二 A)。但在 *PDF1.2* 方面，候選基因的兩個毛狀根系表現量雖然各有差異，但是跟 *EV control* 比較均有一個 5~14 倍提升的趨勢 (圖十二 B)。而接種 *P. indica* 七天後，除了 *PIIN\_09643OE-5* 毛狀根系中 *PR1* 的表現量為 *EV control* 中 0.08 倍之低以外，*PIIN\_09643OE-8* 與 *PIIN\_11103* 毛狀根系中 *PR1* 的表現量與 *EV control* 相比也僅有 0.4~0.5 倍的表現量 (圖十二 C)。在 *PDF1.2* 方面，與接種三天的情形類似，各個毛狀根系中表現量各有差異，但是跟 *EV control* 比較均高出了 2.8~6.5 倍 (圖十二 D)。



### 3.3.5 *P. indica* 於候選基因毛狀根系中的共生效率

進一步，我們想繼續了解候選基因毛狀根系中 PTI 反應相關防禦基因表現量的下降是否能幫助 *P. indica* 更容易與植物在根部進行共生。因此我們也抽取共生組織的總體基因體做為 q-PCR 中的模版，定量共生組織中 *P. indica* 基因體與植物基因體的比例，做為 *P. indica* 在毛狀根系中共生效率之指標（方法參照第二章第九節，示意圖見附錄圖五）。*P. indica* 接種三天後，*PIIN\_09643 OE-5* 毛狀根系中 *P. indica* 在根部的共生量高達 *EV control* 的 10 倍；*PIIN\_09643 OE-8* 毛狀根系中高達 14 倍；*PIIN\_11103 OE-2* 毛狀根系中高達 4 倍；*PIIN\_11103 OE-4* 毛狀根系中高達 7 倍（圖十三 A）。*P. indica* 接種七天後，*PIIN\_09643 OE-5* 毛狀根系中 *P. indica* 在根部的共生量高達 *EV control* 的 2.5 倍；*PIIN\_09643 OE-8* 毛狀根系中高達 3 倍；*PIIN\_11103 OE-2* 毛狀根系中高達 2.1 倍；*PIIN\_11103 OE-4* 毛狀根系中高達 6.5 倍。與接種三天時一樣有較 *EV control* 高的趨勢（圖十三 B）。

## 第四節 候選基因純化蛋白 (recombinant protein) 系統之建立

由於效應蛋白最終是以蛋白質的形式作用於植物細胞，因此我們也建立了候選基因重組蛋白的純化系統，以便在後續實驗中從蛋白質層次上驗證候選基因對植物 PTI 反應防禦基因的影響。

### 3.4.1 載體構築

設計引子、並以共生狀態的 *P. indica* cDNA 做為模版，以 PCR 將 *PIIN\_05990*、*PIIN\_09643*、*PIIN\_11103* 基因之開放閱讀框 (open reading frame, ORF) 全長增幅，接入 yT&A 載體，並經過定序確認接入片段序列無誤。之後以 *EcoRI* 切位將此片段接入 pMALc5X 載體上、受 IPTG 誘導的 Lac promoter 所驅動的半乳糖結合蛋白 (MBP) 與蛋白酶 factor-XA 切位的序列之後，完成

能夠表達候選基因純化蛋白的載體 pMALc5X-PIIN\_05990、pMALc5X-PIIN\_09643、pMALc5X-PIIN\_11103 (附錄圖六)。



### 3.4.2 候選基因純化蛋白系統的誘導純化與半乳糖結合蛋白的切除


為了得到候選基因的基因產物，我們對候選基因純化蛋白系統的誘導與半乳糖結合蛋白的切除進行條件測試。將在第三章第四節 3.4.1 中完成的載體 pMALc5X-PIIN\_05990、pMALc5X-PIIN\_09643、pMALc5X-PIIN\_11103 轉入專門表現重組蛋白的大腸桿菌品系 codon 中，並且測試處理 IPTG 的濃度、誘導溫度與時間（方法參照第二章第十一節）。對於 MBP control (49 kD) 與 PIIN\_05990 (72 kD)、PIIN\_09643 (61 kD) 的重組蛋白來說，0.1 M IPTG，在 28° C 下誘導 4 小時即可得到質量均優的蛋白（圖十四）。而 PIIN\_11103 (61 kD) 的重組蛋白則在誘導 8 小時會有較大量的蛋白（圖十四）。經過純化獲得候選基因重組蛋白之後，以 3 µg/ml 蛋白酶 factor-XA，10 rpm，4° C 均勻震盪隔夜（方法參照第二章第十一節）可切除重組蛋白上的半乳糖結合蛋白，獲得候選基因之基因產物 PIIN\_05990 (24 kD)、PIIN\_09643 (11 kD) 與 PIIN\_11103 (11 kD) (圖十五)。

## 第五節 利用純化蛋白系統探討候選基對植物防禦相關基因的影響

為了驗證候選基因蛋白在植物體中是否如同在轉殖毛狀根系中能壓抑植物 PTI 反應防禦相關基因，我們參考 Plett 等人對於共生真菌效應蛋白 MiSSP7 的研究中對植物處理效應蛋白的條件與方法 (Plett et al., 2011)，並且加以修改（方法參照第二章第十一節）。

### 3.5.1 候選基因蛋白對植物 PTI 反應防禦相關基因的影響

取用五片約一個月大之小白菜健康的葉子，由葉柄剪下葉片成為 detached



leaf。葉柄插入 3.4  $\mu$ M 候選基因蛋白 (溶於 1/2MS 液態培養基)，室溫照光培養 2.5 小時，使蛋白質由傳輸組織運送到葉片組織中產生作用。然後收取樣本，對 detached leaf 中 *PR1* 與 *PDF1.2* 的表現量進行測量。結果發現 CK 組、MBP 處理、PIIN\_05990 處理的葉片中 *PR1* 的表現量並沒有顯著的差異，而 PIIN\_09643 與 PIIN11103 處理的葉片中 *PR1* 的表現量與 CK 組、MBP 處理、PIIN\_05990 處理的葉片相比則僅有 0.6 倍 (圖十六 A)。*PDF1.2* 方面則所有的處理表現量均無顯著差異 (圖十六 B)。此與我們過表現之轉殖毛狀根系的結果相吻合 (圖十一)。

### 3.5.2 候選基因蛋白對於植物感病程度的影響

由 3.5.1 的結果中得知，以 PIIN\_09643 處理葉片以後可以導致防禦基因 *PR1* 表現量的下降。並且在 3.4.4 的結果中亦證實在根部過量表現 *PIIN\_09643* 可以幫助真菌在根部進行共生 (圖十二)。做為佐證，我們亦利用番茄的葉片處理重組蛋白後於葉脈兩側點上濃度  $10^5$ /mL 番茄炭疽病病原 *Botrytis cinerea* 的孢子 10  $\mu$ L，三日後測量炭疽狀病斑的大小以量化病徵 (方法參照第二章第十節)。藉此調查在不同的 plant-microbes interaction model 中，PIIN\_09643 是否也能有影響植物防禦反應、改變植物感病程度之作用。結果發現 CK 組、MBP 處理、PIIN\_05990 處理的葉片上產生的病徵程度並無差異。但是以 PIIN\_09643 蛋白處理以後的葉片與其他處理相比，病徵嚴重程度則有兩倍之高 (圖十七 A、圖十七 B)。



## 第四章 討論

### 第一節 *P. indica* 效應蛋白候選基因之預測

由於效應蛋白作用的機制與影響植物生理的途徑不盡相同。並且，效應蛋白屬於微生物與植物共演化下的產物，彼此間保守度相當低。種種因素使效應蛋白候選基因的挑選困難重重。德國學者 Kogal 等人 在 2013 的著作中提到，藉由排除 *P. indica* 蛋白質體中的穿膜蛋白、粒腺體蛋白與分泌水解酵素後，進一步挑出在 pfam 等蛋白資料庫上，預測有功能性區段的基因產物，可以將候選基因的範圍從 11769 個縮減到 543 個 (Rafiqi et al., 2013)。然而 543 個候選基因的範圍依然非常龐大。並且效應蛋白實際上常常屬於小型分泌蛋白，在蛋白質資料庫的平台中經常不會預測到已知的功能性區段，因此這個篩選方法的效率依然非常有限。而 Zuccaro 等人則從 *P. indica* 感染植物以後的微陣列資料庫 (microarray data) 中挑選出特異表現的基因，並且探討它們為效應蛋白基因的可能性 (Zuccaro et al., 2011)。但真菌與植物共生時亦需要大幅改變自己的生理狀態，特異表現的基因並不限於效應蛋白基因。因此效應蛋白基因的誘導表現量可能不及其他生理基因的變化量。因此，只從特異表現量大的基因挑選，很可能錯失不少真正的效應蛋白基因。


本研究使用生物資訊學方法的篩選中特別注意到效應蛋白常常屬於小型分泌蛋白的事實，因此著重於基因產物大小與分泌性的分析。我們在 *P. indica* 基因體共 11767 個基因中挑選出 10 個預測上會被真菌送入植物核中的基因產物，並且根據前人的微陣列資料庫中挑選出 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 這兩個最有可能在與植物共生時被誘導的候選基因 (圖一、表二)。在之後的實驗中亦證實了我們的預測：這兩個候選基因的確會在 *P. indica* 與小白菜共生時被誘導表現 (圖三、圖四)，並且能被送到植物細胞核中 (圖五) 進行可能的作

用。在這個挑選方式下，我們得以快速的從 11767 個候選基因快速縮減為 10 個，再從其中挑出兩個極有可能的候選，可謂別具效率。

近期，隨著資訊工程的日益進步，machine-learning 的演算方法也開始應用在效應蛋白的預測上。Sperschneider 等人開發出 EffectorP 的效應蛋白預測平台 (<http://effectorp.csiro.au/>) (Sperschneider et al., 2016)。此平台的預測原理是基於眾人上傳已知的效應蛋白資料，對於預測序列進行大小、胺基酸組成、功能、物理性質與化學性質等資訊的分析，進而給出預測序列為效應蛋白的概率。此平台的優點在於能快速便捷的給出預測的可能性，並且隨著輸入的資料越多，其預測基礎也越來越紮實而精準。本研究中的候選基因 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 亦在此平台的預測中得到高達 93% 與 75% 為效應蛋白的預測概率。需要注意的是，目前此平台的預測傾向於給較短的序列高分、較長的序列低分。舉例來說，68 個胺基酸長度的已知共生性效應蛋白 MiSSP7 預測有 99% 的概率為效應蛋白，但另一 270 個胺基酸長度的已知共生性效應蛋白 SP7 則被預測不為效應蛋白。原因可能是效應蛋白種類過為繁多，且目前平台資料庫還不相當豐富所致。然而 EffectorP 依然可以結合本研究中的預測方式，在前期的進行快速的分析。可期望在未來平台資料庫更完備後變成更強而有力的初期篩選工具。

## 第二節 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 於植物細胞中的次細胞定位

目前僅知的兩個共生真菌效應蛋白 Mycorrhizal induced small secreted protein 7 (MiSSP7) 與 Secreted protein 7 (SP7) 皆能進入植物細胞核中發揮作用，以促進真菌的共生。MiSSP7 作用的主要機制是藉由與白楊根組織細胞核內 PtJAZ6 的 JAZ domain 結合，使 JA 路徑的負調控者 PtJAZ6 不容易被降解，進而降低植物 JA 反應，最後造成促進共生的作用 (Plett et al., 2014)。而 SP7 會在藜蒺苜蓿根組織細胞核中與轉錄因子 MtERF19 交互作用，並且抑制由



MtERF19 所調控的免疫相關基因如 *PR10-1* 的表現量，減緩真菌共生時在植物體中引起的免疫反應，使共生順利進行 (Kloppholz et al., 2011)。而本研究中的結果指出 PIIN\_09643 與 PIIN\_11103 在植物細胞中的次細胞定位也同 MiSSP7 與 SP7 一樣，集中在細胞核 (圖五)。我們推論，PIIN\_09643 與 PIIN\_11103 也有可能藉由與植物核中某種生理途徑的調控者交互作用，進而將植物體內的生理引導到適合真菌共生的狀態。另外，PIIN\_09643 在序列分析上存在著預測出 BAF1/ABF1 chromatin reorganizing factor 的相似區段 (圖二)，BAF1/ABF1 chromatin reorganizing factor 是一個功能未知，但可能具有 zinc finger、並且能與 chromatin 進行結合的蛋白質。根據這個預測結果，我們也不排除 PIIN\_09643 能直接與植物 DNA 交互作用，並且直接影響植物生理基因表現量的可能性。

### 第三節 PIIN\_09643 與 PIIN\_11103 對植物氧化還原狀態相關基因的影響

過去文獻指出，*P. indica* 與植物共生後可以藉由提高植物中 *Glutathione-S transferase tau (GSTU)* 與 antioxidant recycling 基因如 *Monodehydroascorbate reductase2 (MDAR2)* 與 *Dehydroascorbate reductase5 (DHAR5)* 等的表現量，進而產生還原物質含量提升、超氧化物含量下降，以及 redox-ratio 的變化 (Lee et al., 2011; Kao, 2013; Vadassery et al., 2009)。本研究中，PIIN\_09643 與 PIIN\_11103 的毛狀根系中，DHAR5 的基因表現量類似於植物與 *P. indica* 共生後的情形 (Vadassery et al., 2009)，提升為控制組的三倍 (圖十)；而 GSTU 的基因表現量也與本實驗室先前的研究吻合 (Kao, 2013)，提升為控制組的兩倍 (圖十)。因此說明 PIIN\_09643 與 PIIN\_11103 的確影響 DHAR5 與 GSTU 表現量的上升，並推測有可能參與在此兩基因所調控的抗氧化系統之中。然而，MDAR2 的表現量並不受 PIIN\_09643 與 PIIN\_11103 所影響 (圖十)。近期文獻指出，對植物處理 SA 以後可以增加植物體內 glutathione 的含量以及其還原






態的比例 (Spoel and Loake, 2011) , 而在 JA 路徑的植株中則有相反的趨勢 (Mateo et al., 2006) 。因此 SA 路徑的反應會使植物體內 glutathione 的 redox ratio 維持在比較高的狀態。為了提高還原態 glutathione 的比例, 並且減少氧化態 glutathione 的比例, 植物體內消耗還原態 glutathione 的代謝酵素如 DHAR 與 GST 等的基因表現量很有可能為了達成產物與反應的平衡而進行負調控。而本研究的結果發現, *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 參與了 SA 路徑的調控 (參見第三章第三節 3.3.3 之結果, 以及第四章第四節之討論) 。因此我們推測 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 毛狀根系中 *DHAR5* 與 *GSTU* 表現量的提升是因為受到 SA 路徑負調控所間接引起, 而 *MDAR2* 因為不以 glutathione 為受質, 因此就不容易受到 glutathione redox ratio 的變化而產生調控。

#### 第四節 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 對 PTI 反應指標基因與共生效率的影響


本研究中針對候選基因對植物 PTI 反應相關指標基因的影響做分析, 係由於效應蛋白常見的重要功能為壓抑 (或調節) 植物的免疫反應以利於微生物在植物體內的生長、生殖與傳播。過去文獻指出 PTI 反應中, 植物常依賴 SA 下游反應來因應 biotrophic 營養方式微生物的出現 (Glazebrook et al, 2005) 。而 *P. indica* 於共生初期也屬於 biotrophic 營養方式 (Jacobs et al., 2011) , 因此接觸植物時同樣會引發 SA 路徑的下游反應與指標基因如 *PRI*、*PR10*、*WRKY22*、*CBP60g* 等的表現 (Schafer et al., 2009; Jacobs et al., 2011; Lahrmann et al., 2013) 。在大麥與阿拉伯芥的研究裡指出, *P. indica* 與 SA 路徑強表現背景的植株共生時, 無法調控 SA 的下游反應, 且與植物的共生效率也較低。反之, *P. indica* 與 JA 路徑強表現背景的植株共生時, 與植物的共生效率則較高 (Schafer et al., 2009; Jacobs et al., 2011) 。說明了 *P. indica* 調控植物 PTI 中 SA 的反應對於共生非常重要。

本研究的結果中, *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 能夠壓抑毛狀根系中 PTI 反



應 SA 路徑下的重要指標基因 *PR1* 的表現 (圖十一) , 以 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 的蛋白質處理植物葉片以後也能觀察到一樣的結果 (圖十六 A) 。然而對於 PTI 反應 JA 路徑下的重要指標基因 *PDF1.2* 的表現則沒有特別的影響 (圖十一、圖十六 B) 。而將 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 毛狀根系接種 *P. indica* 後發現, 共生狀態下 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 一樣可以壓抑 *PR1* 的表現量 (圖十二 A、圖十二 C) , 並且能提升 *P. indica* 與植物的共生量 (圖十三 A、圖十三 B) 。因此說明 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 應該具有調控 SA 路徑並且促進與植物共生的作用。

過去在阿拉伯芥中的研究中指出, *P. indica* 能在與植物接觸後的第三天以目前未知的方式壓抑 SA 相關的反應與指標基因的表現 (Lahrmann et al., 2013) , 並且開始大量進入植物根部皮層進行 intracellular colonization (Jacobs et al., 2011) 。而 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 在與植物的共生階段正是在約與植物接觸後第三天被誘導表現 (圖三、圖四 B、圖四 C) , 並且具有調控 SA 路徑並且促進與植物共生的作用。這些結果暗示著 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 可能就是 *P. indica* 用以調控 SA 下游反應、調節早期共生時遭遇的植物 PTI 防禦反應、並且藉此順利與植物進行共生的效應蛋白之二。同時也解釋了, 為何在毛狀根系與 *P. indica* 的共生試驗中, 感染三天時, *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 對於 *PR1* 表現量的抑制 (圖十二 A、圖十二 C) 與對共生效率的提升會明顯高於感染七天的時期 (圖十三 A、圖十三 B) 。原因可能是因為, 感染三天時 *EV control* 的共生系統中還不存在效應蛋白以壓抑植物的防禦反應, 因此 *P. indica* 也還為能大量進入植物進行共生。相反的候選基因轉殖根系的共生系統中存在大量的效應蛋白, 壓抑植物的防禦反應, 使 *P. indica* 在與植物接觸早期的階段便能大量進入植物進行共生了。而在感染七天以後, *EV control* 的共生系統中也開始有效應蛋白的存在, 使 *P. indica* 開始大量進入植物根部, 此時與候選基因轉殖根系的差異便縮小了。



另外，雖然 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 在毛狀根系中與蛋白處理的實驗中對 *PDF1.2* 的表現沒有特別的影響（圖十一、圖十六 B）。但是當毛狀根系與 *P. indica* 共生時，*PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 能使 *PDF1.2* 的表現量提升（圖十二 B、圖十二 D）。*P. indica* 與植物共生時 JA 相關的指標基因表現量如 *VSP2* 等會上升（Jacobs et al., 2011; Qiang et al., 2012），且 JA 與 SA 的反應常常有拮抗的平衡關係（Glazebrook et al, 2005）。因此我們推測 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 也可能會與 *P. indica* 共生時產生的其他效應蛋白，或是 *P. indica* 其他未知的因子共同作用，近而提升 JA 路徑的表達，以加強對 SA 路徑的壓抑。

#### 第五節 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 於共生時可能扮演的角色與機制

前文的結果與討論中，我們推論 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 應該具有調控 SA 路徑的作用。現有文獻指出對番茄處理 SA 以後能增進番茄對 *B. cinerea* 的抵抗力（Spoel and Loake, 2011），而蕃茄 SA 路徑缺失的植株則更容易感染 *B. cinerea*（Mateo et al., 2006）。因此說明番茄與 *B. cinerea* 之間的感病關係中 SA 路徑有決定性的影響。本研究中以 *PIIN\_09643* 純化重組蛋白處理番茄葉片後發現，番茄對 *B. cinerea* 的感病程度顯著提升（圖十七 A、圖十七 B）。說明 *PIIN\_09643* 的作用並不局限於小白菜與 *P. indica* 的模式，而是能廣泛做用於不同種植物中的 SA 路徑。也因為 SA 路徑在植物演化的過程中極為保守，我們推論這或許是 *P. indica* 宿主範圍極廣的原因之一。

而綜合本研究中的結果以及以上的討論，*PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 能於 *P. indica* 共生時的早期被誘導表現，並且其蛋白產物在植物細胞中能被送往細胞核發揮作用。而 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 也能藉由壓抑 SA 路徑指標基因的表現以及提升 *P. indica* 在植物中的共生量。因此我們認為 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 很可能就是 *P. indica* 用以壓抑 SA 路徑，減弱植物早期防禦反應

以促進共生之效應蛋白。並且因為抑制了 SA 的路徑，間接提升了 glutathione 氧化還原相關基因 *DHAR5* 與 *GSTU* 的表現量 (圖十八)。



## 第六節 未來展望

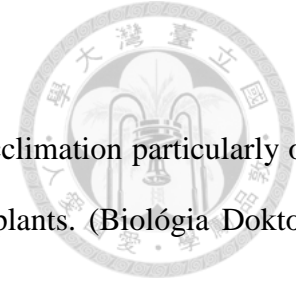
在本研究中，我們嘗試以蛋白質大小與分泌性為挑選候選基因的重點，並且結合過去其他研究團隊預測方式的優點，接著再以分析次細胞定位與共生時的表現樣態做驗證，極有效率的縮小挑選範圍，使得後續對於複數個候選基因之深入分析更加可行。由於 *P. indica* 是共生在植物根部的真菌，毛狀根的系統也提供了候選基因對根組織影響的研究模式。另外，藉由農根菌可以快速而穩定的將候選基因表達在生長快速的毛狀根系中，非常適合以此為樣本，快速在基因層次上探索可能被候選基因影響的植物基因群。接著本研究也建立了純化蛋白系統處理野生型小白菜，除了在蛋白層次上對基因層次的分析結果做再驗證以外 (圖十六、圖十七)，也多少去除了農根菌轉殖對植物內生基因造成的變因與誤差。最後挑出了 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 兩個非常值得繼續深入研究的基因。

為了更深入探討 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 的功能，未來建議在阿拉伯芥上建立穩定轉植株以及在 *P. indica* 上建立 knockout line，除了可以更精確的分析表型以外，還能藉由這兩種材料的共生實驗觀察是否在 SA 防禦相關基因表現量與共生效率上是否有補償效果，藉此多方證實本研究中的結論。此外，為了探討 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 在植物中的作用機制，未來亦可以 Yeast-two hybrid、CoIP 等蛋白質-蛋白質交互作用的實驗找出在植物中與效應蛋白交互作用的對象。甚至可以與 ChIP 等蛋白質-DNA 交互作用的實驗探索效應蛋白是否有直接調控植物基因表達的可能性。希望本研究的經驗在未來能幫助找出更多 *P. indica* 效應蛋白，成為研究菌根菌與植物間共生機制的一份助力。



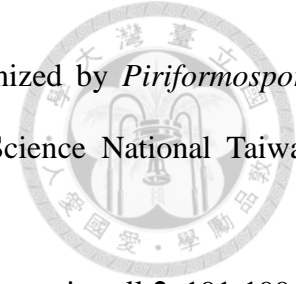
## 參考文獻

- Azami-Sardooei, Z., França, S.C., De Vleeschauwer, D., and Höfte, M.** (2010). Riboflavin induces resistance against *Botrytis cinerea* in bean, but not in tomato, by priming for a hydrogen peroxide-fueled resistance response. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **75**, 23-29.
- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B.D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K.H., Schafer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., and Skoczowski, A.** (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist* **180**, 501-510.
- Chou, K.C., and Shen, H.B.** (2008). Cell-PLoc: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nature protocols* **3**, 153-162.
- Cao, Y., Zhang, Z.W., Xue, L.W., Du, J.B., Shang, J., Xu, F., Yuan, S., and Lin, H.H.** (2009). Lack of salicylic acid in Arabidopsis protects plants against moderate salt stress. *Journal of biosciences* **64**, 231-238.
- Daneshkhah, R., Cabello, S., Rozanska, E., Sobczak, M., Grundler, F.M., Wieczorek, K., and Hofmann, J.** (2013). *Piriformospora indica* antagonizes cyst nematode infection and development in Arabidopsis roots. *Journal of experimental botany* **64**, 3763-3774.
- Das, A., Kamal, S., Shakil, N.A., Sherameti, I., Oelmuller, R., Dua, M., Tuteja, N., Johri, A.K., and Varma, A.** (2012). The root endophyte fungus *Piriformospora indica* leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii*. *Plant signaling and behavior* **7**, 103-112.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S.** (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The*



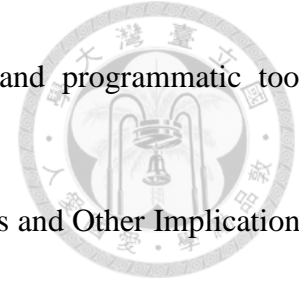
Plant journal : for cell and molecular biology **45**, 616-629.

- Edit, H.** (2015). Effect of salicylic acid pre-treatment on salt stress acclimation particularly on the role of glutathione transferases in tomato and Arabidopsis plants. (Biológia Doktori Iskola Növénybiológiai Tanszék)
- Erhardt, M., Namba, K., and Hughes, K.T.** (2010). Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**, a000299.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual review of phytopathology **43**, 205-227.
- Hao, L., Zhao, Y., Jin, D., Zhang, L., Bi, X., Chen, H., Xu, Q., Ma, C., and Li, G.** (2011). Salicylic acid-altering Arabidopsis mutants response to salt stress. Plant and Soil **354**, 81-95.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nurnberger, T., and Sheen, J.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. Cell **125**, 563-575.
- Huitema, E., Bos, J.I., Tian, M., Win, J., Waugh, M.E., and Kamoun, S.** (2004). Linking sequence to phenotype in Phytophthora-plant interactions. Trends in microbiology **12**, 193-200.
- Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Lipka, V., Kogel, K.H., and Schafer, P.** (2011). Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of Arabidopsis roots by the fungus *Piriformospora indica*. Plant physiology **156**, 726-740.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. Nature **444**, 323-329.
- Kale, S.D., and Tyler, B.M.** (2011). Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells. Cellular microbiology **13**, 1839-1848.
- Kao.** (2013). Functional characterization of selective genes responsible for growth promotion in



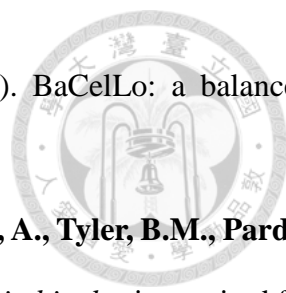
Chinese cabbage (*Brassica campestris* subsp.*Chinensis*L.) colonized by *Piriformospora indica*. (Graduate Institute of Plant Biology College of Life Science National Taiwan University Master Thesis).

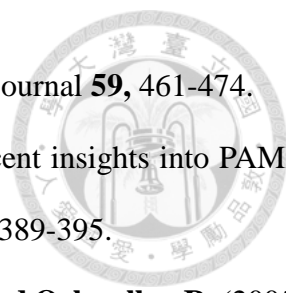
- Kamoun, S.** (2003). Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic cell* **2**, 191-199.
- Kloppholz, S., Kuhn, H., and Requena, N.** (2011). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current biology* **21**, 1204-1209.
- Klute, A.** (2011). Detection and characterization of secreted proteins from *Piriformospora indica* during Arabidopsis roots colonization. (Durchgeföhrt am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie).
- Kumar, G., Kushwaha, H.R., Panjabi-Sabharwal, V., Kumari, S., Joshi, R., Karan, R., Mittal, S., Pareek, S.L.S., and Pareek, A.** (2012). Clustered metallothionein genes are co-regulated in rice and ectopic expression of OsMT1e-P confers multiple abiotic stress tolerance in tobacco via ROS scavenging. *BMC plant biology* **12**, 1-16.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant cell* **16**, 3496-3507.
- Lahrman, U., Ding, Y., Banhara, A., Rath, M., Hajirezaei, M.R., Dohlemann, S., von Wiren, N., Parniske, M., and Zuccaro, A.** (2013). Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 13965-13970.
- Lee, Y.C., Johnson, J.M., Chien, C.T., Sun, C., Cai, D., Lou, B., Oelmüller, R., and Yeh, K.W.** (2011). Growth promotion of Chinese cabbage and Arabidopsis by *Piriformospora indica* is not stimulated by mycelium-synthesized auxin. *Molecular plant-microbe interactions* **24**, 421-431.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N.,**



- and Lopez, R.** (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic acids research*.
- Flor, H. H.** (1955). Host-Parasite Interaction in Flax Rust - Its Genetics and Other Implications. *Phytopathology* **45**(12): 680-685.
- Martin, F., Aerts, A., Ahren, D., Brun, A., Danchin, E.G., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H.J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buee, M., Brokstein, P., Canback, B., Cohen, D., Courty, P.E., Coutinho, P.M., Delaruelle, C., Detter, J.C., Deveau, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucic, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P.J., Jain, P., Kilaru, S., Labbe, J., Lin, Y.C., Legue, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Oudot-Le Secq, M.P., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kues, U., Lucas, S., Van de Peer, Y., Podila, G.K., Polle, A., Pukkila, P.J., Richardson, P.M., Rouze, P., Sanders, I.R., Stajich, J.E., Tunlid, A., Tuskan, G., and Grigoriev, I.V.** (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**, 88-92.
- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D., and Ausubel, F.M.** (2010). Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant cell* **22**, 973-990.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19613-19618.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H.** (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth* **8**, 785-786.



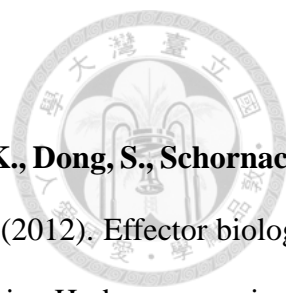
- 
- Pierleoni, A., Martelli, P.L., Fariselli, P., and Casadio, R.** (2006). BaCellLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics* **22**, e408-416.
- Plett, J.M., Kemppainen, M., Kale, S.D., Kohler, A., Legue, V., Brun, A., Tyler, B.M., Pardo, A.G., and Martin, F.** (2011). A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current biology* **21**, 1197-1203.
- Plett, J.M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssieres, A., Deveau, A., Melton, S.J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J.L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., and Martin, F.** (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 8299-8304.
- Po-Wen, C., Singh, P., and Zimmerli, L.** (2013). Priming of the Arabidopsis pattern-triggered immunity response upon infection by necrotrophic *Pectobacterium carotovorum* bacteria. *Molecular plant pathology* **14**, 58-70.
- Qiang, X., Weiss, M., Kogel, K.H., and Schafer, P.** (2012). *Piriformospora indica*-a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Molecular plant pathology* **13**, 508-518.
- Rafiqi, M., Jelonek, L., Akum, N.F., Zhang, F., and Kogel, K.H.** (2013). Effector candidates in the secretome of *Piriformospora indica*, a ubiquitous plant-associated fungus. *Frontiers in plant science* **4**, 228.
- Rajabi, S., Karimzadeh, G., and Ghanati, F.** (2012). Salt-induced Changes of Antioxidant Enzymes Activity in Winter Canola (*Brassica napus*) Cultivars in Growth Chamber. *Journal of Plant Physiology & Breeding* **2**, 11-21.
- Schafer, P., Pfiffi, S., Voll, L.M., Zajic, D., Chandler, P.M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kuhnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U., and Kogel, K.H.** (2009). Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic

- 
- association of barley roots with *Piriformospora indica*. The Plant journal **59**, 461-474.
- Schwessinger, B., and Zipfel, C.** (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. Current opinion in plant biology **11**, 389-395.
- Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A., and Oelmuller, R.** (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and Arabidopsis roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. The Journal of biological chemistry **280**, 26241-26247.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. The Plant journal **64**, 204-214.
- Sperschneider, J., Gardiner, D.M., Dodds, P.N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K.B., Manners, J.M., and Taylor, J.M.** (2016). EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. New Phytol **210**, 743-761.
- Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.H., and Waller, F.** (2008). Systemic resistance in Arabidopsis conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. Plant & cell physiology **49**, 1747-1751.
- Sun, C., Johnson, J.M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmuller, R., and Lou, B.** (2010). *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. Journal of plant physiology **167**, 1009-1017.
- Tseng, T.-T., Tyler, B.M., and Setubal, J.C.** (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. BMC microbiology **9**, S2-S2.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F.** (2009). Network properties

of robust immunity in plants. *PLoS genetics* **5**, e1000772.

- Vadassery, J., Tripathi, S., Prasad, R., Varma, A., and Oelmüller, R.** (2009). Monodehydroascorbate reductase 2 and dehydroascorbate reductase 5 are crucial for a mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis*. *Journal of plant physiology* **166**, 1263-1274.
- Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartmann, A., and Oelmüller, R.** (2012). *Piriformospora indica*: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. *Agricultural Research* **1**, 117-131.
- Varma, A., Savita, V., Sudha, Sahay, N., Bütehorn, B., and Franken, P.** (1999). *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2741-2744.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütehorn, B., and Franken, P.** (1998). *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a New Root-Colonizing Fungus. *Mycologia* **90**, 896-903.
- Waller, F., Achatz, B., and Kogel, K.-H.** (2007). Analysis of the Plant Protective Potential of the Root Endophytic Fungus *Piriformospora indica* in Cereals. In *Advanced Techniques in Soil Microbiology*, A. Varma and R. Oelmüller, eds (Springer Berlin Heidelberg), pp. 343-354.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P., and Kogel, K.H.** (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13386-13391.
- Weiss, M., Selosse, M.-A., Rexer, K.-H., Urban, A., and Oberwinkler, F.** (2004). Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential.

Mycological Research **108**, 1003-1010.

- 
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D.G., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S.A., and Kamoun, S.** (2012). Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology **77**, 235-247.
- Yadav, V., Kumar, M., Deep, D.K., Kumar, H., Sharma, R., Tripathi, T., Tuteja, N., Saxena, A.K., and Johri, A.K.** (2010). A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. The Journal of biological chemistry **285**, 26532-26544.
- Yu, C.S., Lin, C.J., and Hwang, J.K.** (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. Protein science : a publication of the Protein Society **13**, 1402-1406.
- Zamioudis, C., and Pieterse, C.M.J.** (2011). Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. Molecular Plant-Microbe Interactions **25**, 139-150.
- Zhou, J.M., and Chai, J.** (2008). Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. Current opinion in microbiology **11**, 179-185.
- Zipfel, C.** (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. Current opinion in immunology **20**, 10-16.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. Nature **428**, 764-767.
- Zuccaro, A., Lahrmann, U., Guldener, U., Langen, G., Pfiffli, S., Biedenkopf, D., Wong, P., Samans, B., Grimm, C., Basiewicz, M., Murat, C., Martin, F., and Kogel, K.H.** (2011). Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. PLoS pathogens **7**, e1002290.

## 圖表

### 表一、雙重扣減式 cDNA 基因庫定序 *P. indica* 與小白菜共生後特異表現之基因

2 dai (day after inoculation)、4dai、7dai 代表以 *P. indica* 感染小白菜後 2、4、7 天，共生根系的 dscDNA 為 driver cDNA 所建立之雙重扣減式 cDNA 基因庫。Not mapped reads 為定序通量，contigs 為所組合出的 contig 數目。*P. indica* hits 為組合出的 contig 到 NCBI 資料庫中所提供之 blastn 服務進行分析。Hits 為 NCBI blastn 分析中 unhit 的序列到 JGI 資料庫中 *P. indica* 的資料庫所提供之 blastx 服務進行分析，分析為 alignment hit score>80，E-value<E-020，%identity>80%的結果，視為 *P. indica* 於共生階段特異表現之基因。



Sample	RNA-Seq analysis 比對P. indica database AssemblyScaffolds contig (含annotation)				De novo assembly using RNA-Seq unmapped reads							blasn in NCBI		blasn in database of <i>P. indica</i>			
	Mapped reads	Not mapped reads	Mapped percentage of read	Mapped percentage of base	Total Reads	Mapped reads	Not mapped reads	Mapped percentage of read	Contigs	<i>P. indica</i> hits	Unhits	Hits	Contig number	Gene ID	Annotation		
2dai	297,751	18,197,728	1.6%	0.85%	18,197,728	14,856,491	3,341,237	81.6%	216	3	10	0	-	-	-		
4dai	562,111	23,568,296	2.33%	1.26%	23,568,296	13,938,607	9,629,689	59.1%	4,124	5	649	1	3741	<i>PIIN_05767</i>	-		
7dai	454,761	19,518,126	2.28%	1.39%	19,518,126	15,131,721	4,386,405	77.5%	3,750	15	582	3	2957	<i>PIIN_03688</i>	C-type lectin		
													3453	<i>PIIN_05990</i>	Chitinase		
													3530	<i>PIIN_03013</i>	Concanavalin A-like lectin/glucanase		



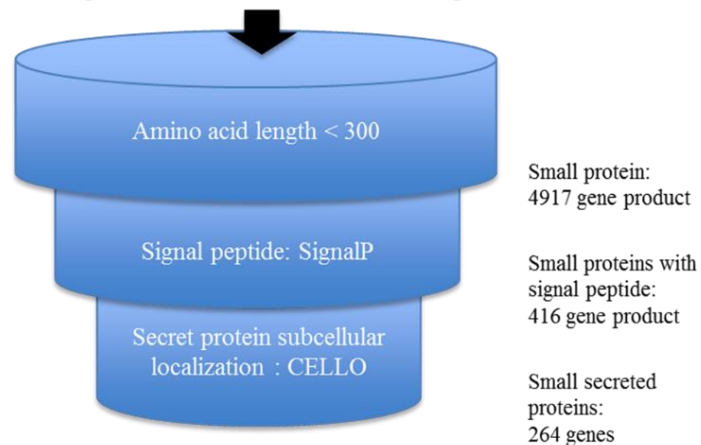
## 表二、經 BaCelLo 與 Cell-PLoc 分析後所得十個候選基因與其特性

欄一： *P. indica* 基因體資料庫中的基因編號。欄二：由 *P. indica* 基因組資料庫中的 gene annotation。欄三：是否屬於 DELD 蛋白基因。欄四：於公開發表的微陣列數據中，表現量是否能被共生所誘導。\*符號表示肯定。

Gene ID in <i>P.indica</i> database	Feature	DELD	Induced in symbiosis phase (microarray data)
<i>PIIN_09895</i>			<i>In H. vulgare</i>
<i>PIIN_05932</i>			
<i>PIIN_10451</i>	Transcription factor	*	
<i>PIIN_10147</i>	Glycohydrolase		
<i>PIIN_08870</i>	HRPII		<i>In A. thaliana</i>
<i>PIIN_05865</i>		*	<i>In A. thaliana</i>
<i>PIIN_09643</i>	Zn finger	*	<i>In H. vulgare</i> <i>In A. thaliana</i>
<i>PIIN_05098</i>	Transcription factor	*	<i>In A. thaliana</i>
<i>PIIN_06837</i>	Transcription factor	*	<i>In H. vulgare</i>
<i>PIIN_11103</i>			<i>In H. vulgare</i> <i>In A. thaliana</i>

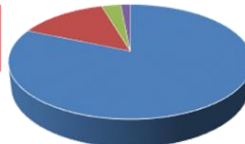


Whole genome of *P.indica*: 11767 genes



**Extracellular protein:264 (CELLO)**

- only Secreted: 215
- both in Nucleus: 37
- both in Cytosol: 8
- both in Chloplast: 4

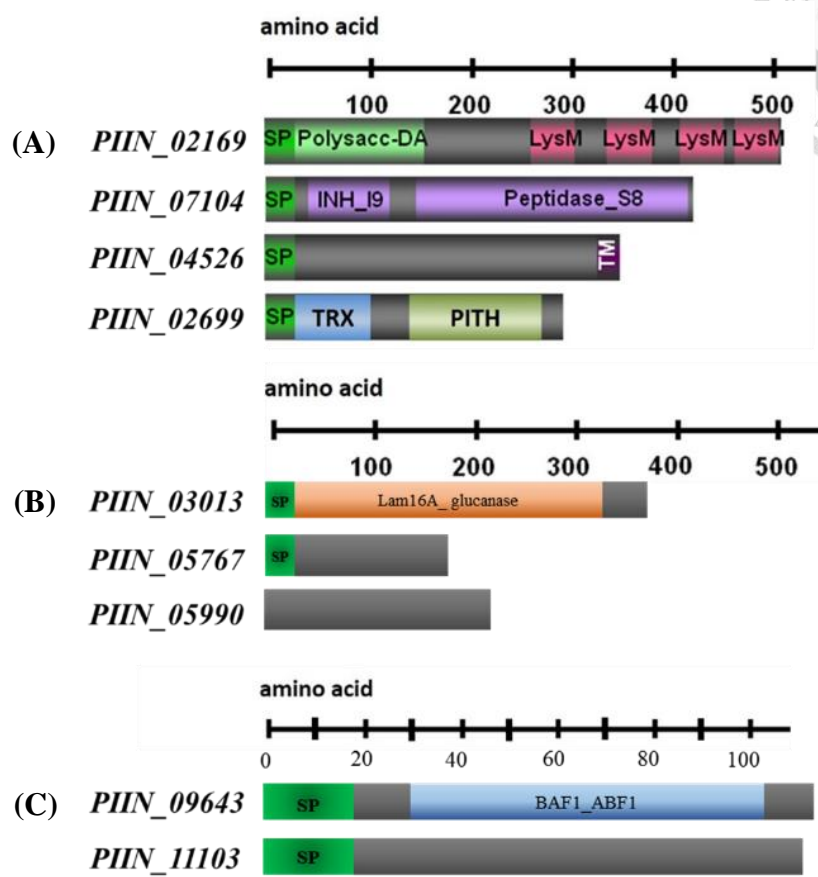


BaCelLo and Cell Ploc prediction:  
Secreted out of fungal cell ,but in nucleus of planta:10

### 圖一、由生物資訊學方法自 *P. indica* 基因體中挑選候選效應蛋白基因

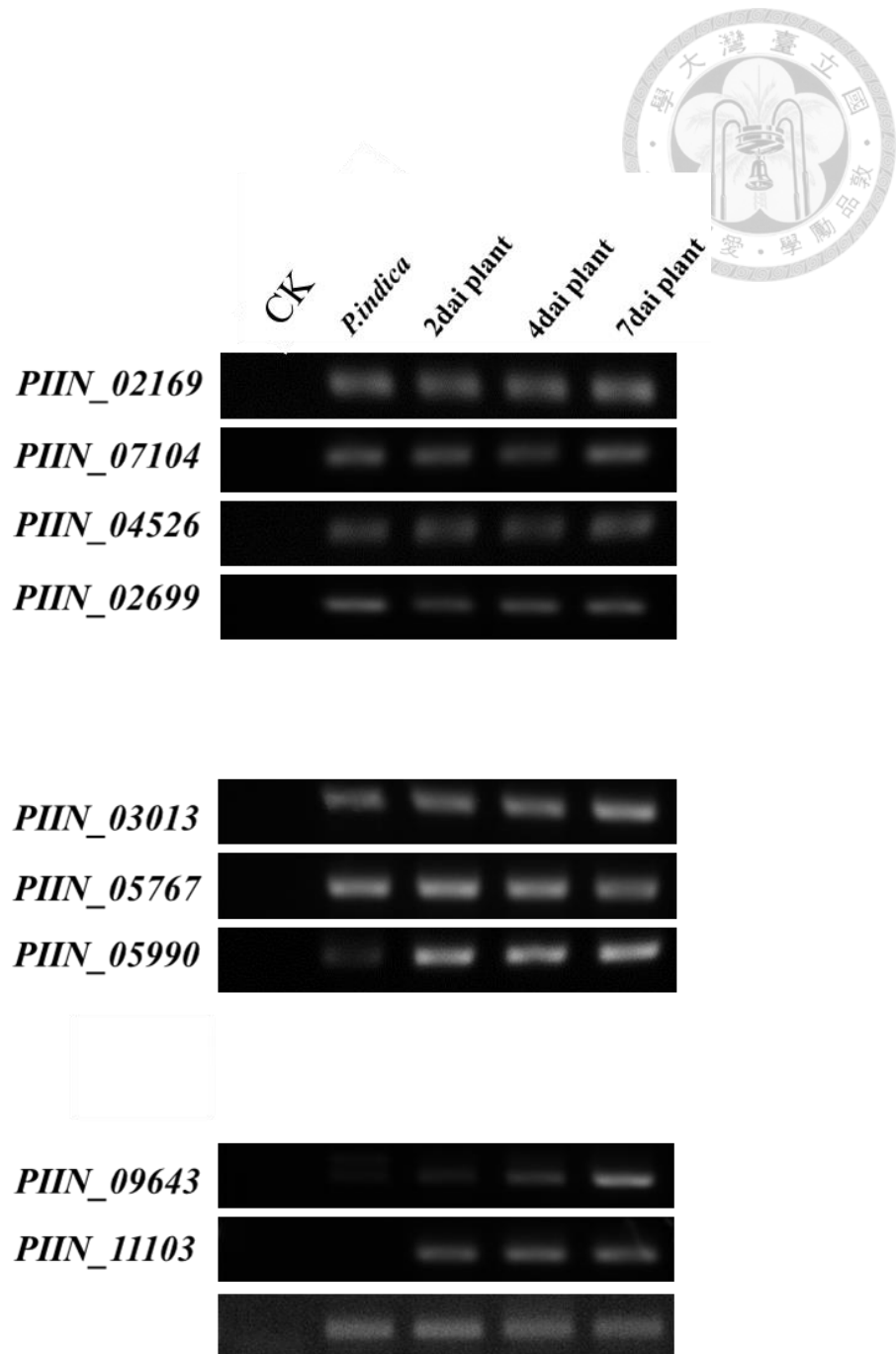
參照方法第二章第五節 2.5.2，經由 SignalP、CELLO、BaCelLo 與 Cell Ploc 等生物資訊平台提供的線上服務分析，自 *P. indica* 基因體中篩選出可能被送出真菌細胞、並且運輸到植物核內的基因產物。





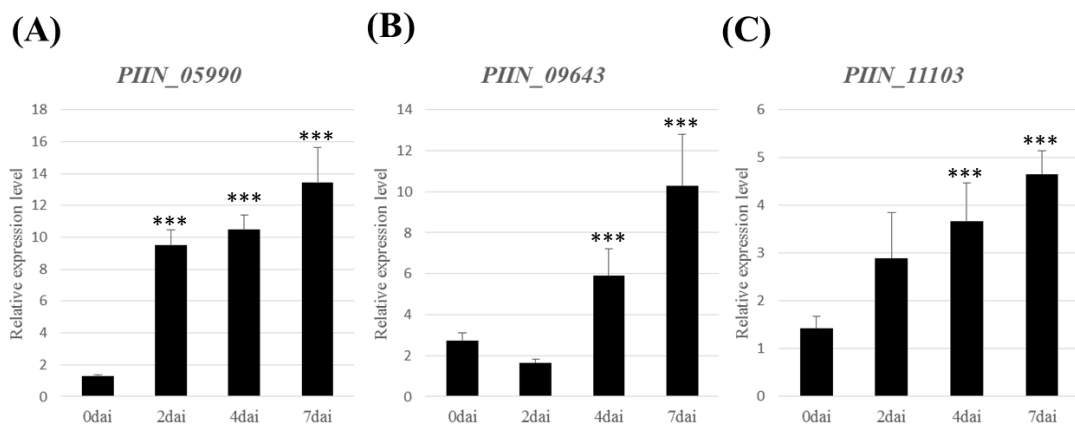
圖二、九個候選基因產物大小與功能性區段分布情形

(A) 利用雙重扣減式基因表現標籤與前人文獻挑選之候選效應蛋白胺基酸構造示意圖。(B) 利用雙重扣減式 cDNA 基因庫挑選之候選效應蛋白胺基酸構造示意圖 (C) 利用生物資訊方法挑選之候選效應蛋白胺基酸構造示意圖基因產物大小以長度表示。SP 為 signal peptide; TM 為 transmembrane domain; LysM 為 lysine motif domain; Polysacc-DA 為 polysaccharide-deacetylase domain; Inh I9 為 inhibitor I9 domain; THX 為 thioredoxin domain; PITH 為 Proteasome-Interacting Thioredoxin domain; Lam16A\_ glucanase 為 Laminarinase 16A; BAF1\_ABF1 為 BAF1 / ABF1 chromatin reorganizing factor。



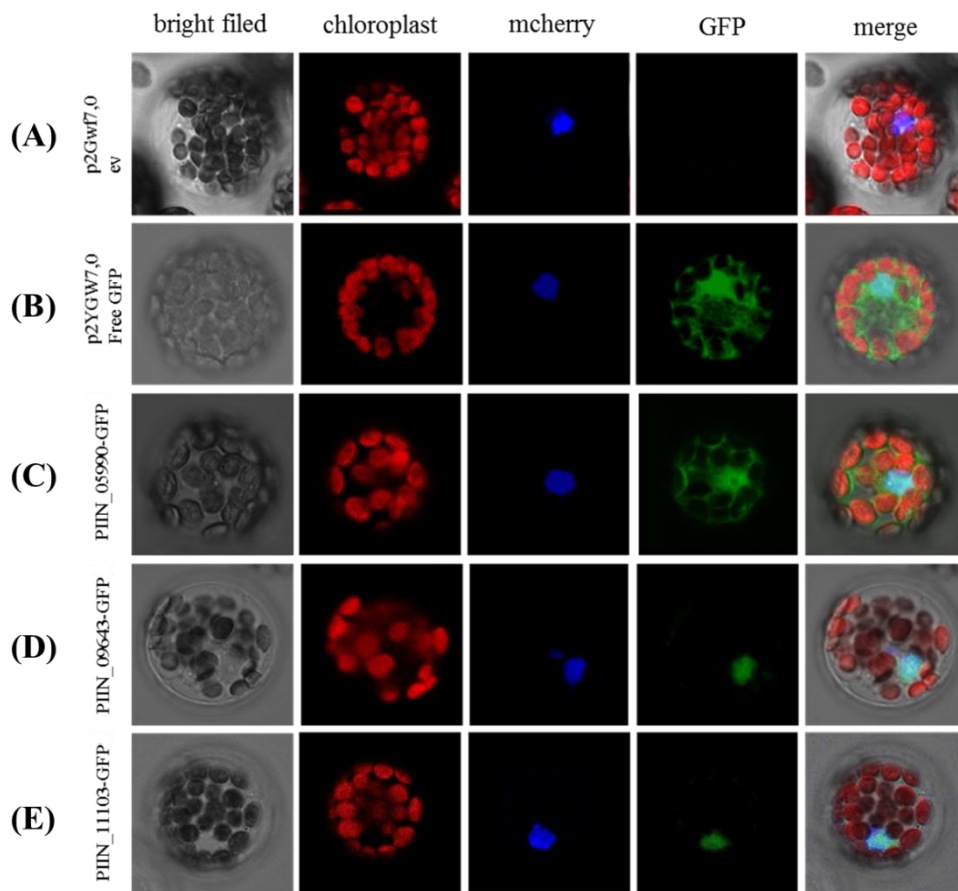
圖三、候選基因於 *P. indica* 感染階段之表現樣態

以 RT-PCR 檢測候選基因於感染階段的表現樣態。CK：未感染之小白菜，為 negative control。 *P. indica*：液態培養之 *P. indica* 菌絲，代表 0 dai。2 dai、4 dai、7 dai：以 *P. indica* 感染三天大的小白菜、經感染 2、4、7 天後之小白菜根系採樣分析基因表現。 *PiTEF1a* (translation elongation factor 1a) 為 Internal control。



圖四、*PIIN\_05990*、*PIIN\_09643*、*PIIN\_11103* 於 *P. indica* 感染階段之表現樣態

以 q-PCR 檢測 (A) *PIIN\_05990*、(B) *PIIN\_09643*、(C) *PIIN\_11103* 於感染階段的表現樣態。*PiTEF1a* (translation elongation factor 1a) 為 internal control。0 dai：液態培養之 *P. indica* 菌絲。2 dai、4 dai、7 dai：以 *P. indica* 感染三天大的小白菜、經感染 2、4、7 天後之小白菜根系採樣分析基因表現。*PiTEF1a* (translation elongation factor 1a) 為 Internal control。N>40。\*：p value<0.1；\*\*：p value<0.00；\*\*\*：p value<0.001。



圖五、PIIN\_05990、PIIN\_09643 與 PIIN\_11103 蛋白之次細胞定位

將 (C) PIIN\_05990；(D) PIIN\_09643；(E) PIIN\_11103 接上綠螢光蛋白後轉入阿拉伯芥之原生質體，並以 NLS-mCherry 做為細胞核之標定。(A)p2GWF7 為 empty vector，GFP 之 negative control。(B)p2YGW7 為 free GFP 之 control。



(A)

-1	M	R	F	A	F	F	A	I	L	F	A	S	A	A	L	W	G	S	A	A	P	I
1	ATG	CGC	TTC	GCC	TTC	TTT	GCT	ATA	CTC	TTT	GCA	TCG	GCT	GCT	CTC	TGG	GGA	TCT	GCA	GCT	CCA	ATT
	TAC	GCG	AAG	CGG	AAG	AAA	CGA	Signal sequence	CGA	CGA	GAG	ACC	CCT	AGA	CGT	CGA	GGT	TAA				
-1	P	D	P	S	L	T	R	A	Q	L	H	A	H	H	Q	S	Q	A	D	H	H	L
67	CCA	GAC	CCT	AGC	TTA	ACC	CGC	GCC	CAG	CTT	CAI	GCC	CAT	CAC	CAA	AGC	CAG	GCT	GAC	CAC	CAT	CTG
	GGT	CTG	GGA	TCG	AAT	IGG	GCG	CGG	GTC	GAA	GTA	CGG	GTA	GIG	GTT	TCG	GTC	CGA	CTG	GIG	GTA	GAC
-1	A	Q	A	E	H	H	L	H	H	A	E	T	H	S	N	H	A	E	A	A	H	Q
133	GCC	CAG	GCA	GAG	CAC	CAC	CTT	CAT	CAT	GCA	GAG	ACA	CAT	TCT	AAT	CAT	GCG	GAG	GCT	GCA	CAC	CAG
	CGG	GTC	CGT	CTC	GIG	GIG	GAA	GTA	GTA	CGT	CTC	TGT	GTA	AGA	TTA	GTA	CGC	CTC	CGA	CGT	GIG	GTC
-1	S	G	N	H	Q	A	A	A	T	H	E	G	Q	Y	R	H	H	M	A	Q	V	D
199	AGT	GGI	AAC	CAC	CAA	GCT	GCT	GCG	ACG	CAC	GAG	GGC	CAA	TAC	CGT	CAC	CAT	ATG	GCA	CAA	GIG	GAT
	TCA	CCA	TTG	GTC	GTT	CGA	CGA	CGC	TGG	CAA	CTC	CAAT	ATG	GCA	GIG	GTA	TAC	CGT	GTT	CAC	CTA	
-1	Y	H	T	A	Q	H	Q	S	H	Q	A	K	A	D	Q	L	A	Q	R	R	S	V
265	TAT	CAI	ACC	GCT	CAA	CAC	CAA	AGC	CAC	CAA	GCT	AAG	GCC	GAC	CAA	CTT	GCT	CAG	CGT	CGT	AGT	GTT
	ATA	GTA	TGG	CGA	GTT	GIG	GTT	ICG	GIG	GTT	CGA	TTC	CGG	CTG	GTT	GAA	CGA	GTC	GCA	GCA	TCA	CAA
-1	Q	S	I	D	E	L	D	*														
331	CAA	AGC	ATA	GAC	GAG	TTG	GAT	TAG														
	GTT	TCG	TAT	CTG	CTC	AAC	CTA	ATC														

(B)

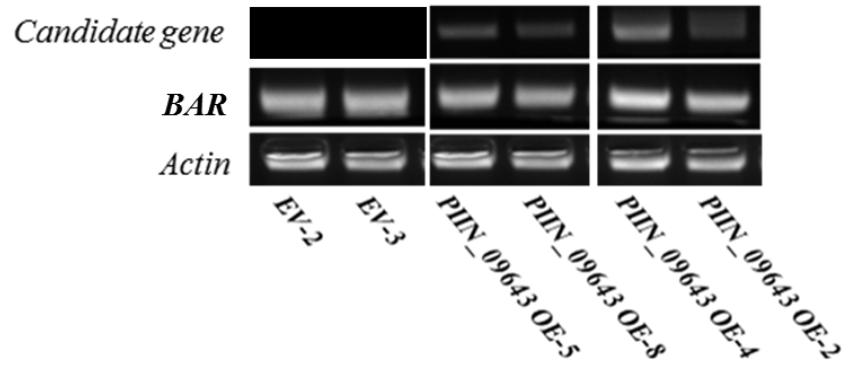
-1	M	R	Y	S	F	I	A	A	V	L	S	T	A	A	L	L	V	S	A	A	P	I
1	ATG	CGC	TAC	TCC	TTC	ATC	GCC	GCT	GTT	CTC	TCC	ACC	GCT	GCT	CTC	CTC	GTC	TCC	GCC	GCT	CCI	ATC
	IAC	GCG	ATG	AGG	AAG	TAG	Signal sequence	CGA	CGA	GAG	GAG	CAG	AGG	CGG	CGA	GGA	TAG					
-1	E	L	D	G	T	H	M	N	S	L	K	A	R	H	N	P	P	P	S	H	T	R
67	GAG	CIT	GAC	GGG	ACC	CAC	ATG	AAC	AGT	CTC	AAG	GCT	CGA	CAC	AAT	CCC	CCA	CCG	TCT	CAC	ACG	CGG
	CIC	GAA	CTG	CCC	IGG	GIG	IAC	ITG	ICA	GAG	ITC	CGA	GCT	GIG	ITA	GGG	GGI	GGC	AGA	GIG	IGC	GCC
-1	A	F	L	H	A	E	A	K	H	D	E	H	A	G	K	A	E	W	H	S	N	K
133	GCA	TTC	CTC	CAT	GCC	GAG	GCC	AAG	CAC	GAC	GAA	CAT	GCC	GGT	AAA	GCC	GAG	TGG	CAT	AGT	AAC	AAG
	CGI	AAG	GAG	GTA	CGG	CTC	CGG	TTC	GIG	CTG	CTT	GTA	CGG	CCA	TTT	CGG	CTC	ACC	GTA	ICA	TIG	TTC
-1	A	D	Q	H	I	S	A	Q	R	S	A	M	D	R	A	A	T	R	P	N	S	V
199	GCG	GAC	CAG	CAC	ATC	AGT	GCC	CAG	AGG	TCT	GCT	ATG	GAC	AGA	GCT	GCG	ACC	CGC	CCC	AAT	TCT	GTT
	CGC	CTG	GTC	GIG	TAG	ICA	CGG	GIC	TCC	AGA	CGA	TAC	CTG	ICT	CGA	CGC	IGG	GCG	GGG	TIA	AGA	CAA
-1	K	H	Y	N	Q	L	M	Q	E	A	V	H	H	G	R	Q	A	D	H	H	I	D
265	AAA	CAC	TAC	AAC	CAG	TTG	ATG	CAA	GAG	GCC	GIG	CAT	CAC	GGT	AGA	CAG	GCC	GAC	CAC	CAT	ATT	GAC
	TTT	GIG	ATG	TTG	GIC	AAC	TAC	GTT	CIC	CGG	CAC	GTA	GIG	CCA	TCT	GTC	CGG	CTG	GIG	GTA	TAA	CTG
-1	R	A	E	*																		
331	CGA	GCA	GAG	TGA																		
	GCT	CGT	CTC	ACT																		

圖六 *PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 候選基因核苷酸序列與胺基酸序列特性分析

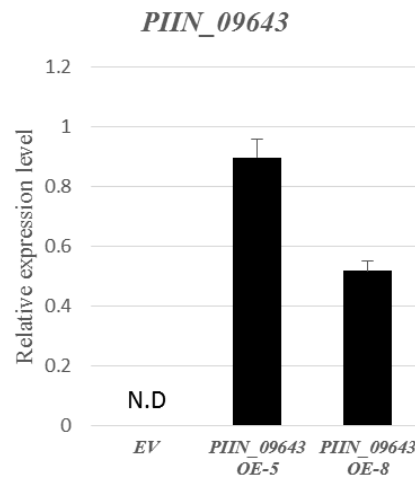
(A)*PIIN\_09643* 詳細核酸序列與轉譯出之胺基酸序列，藍色區段為訊息序列；灰色區段為 BAF1 相似區段；黃色區段為 DELD motif。(B) *PIIN\_11103* 詳細核酸序列與轉譯出之胺基酸序列，藍色區段為訊息序列。



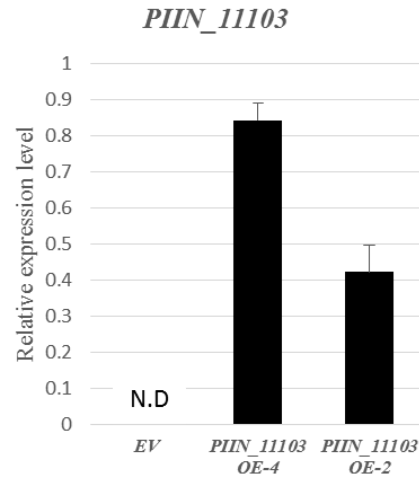
(A)



(B)

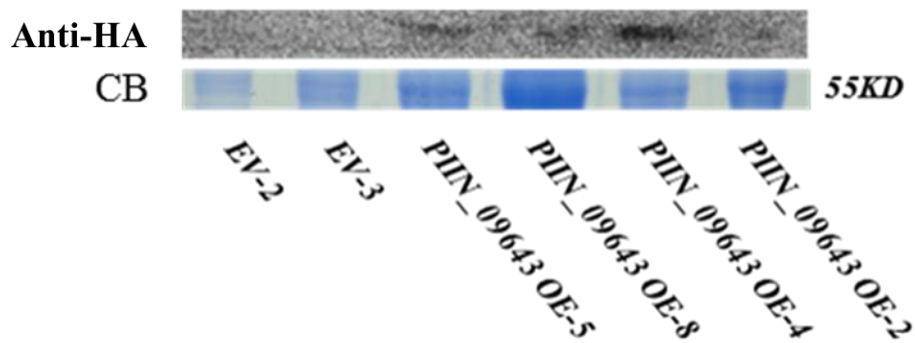


(C)



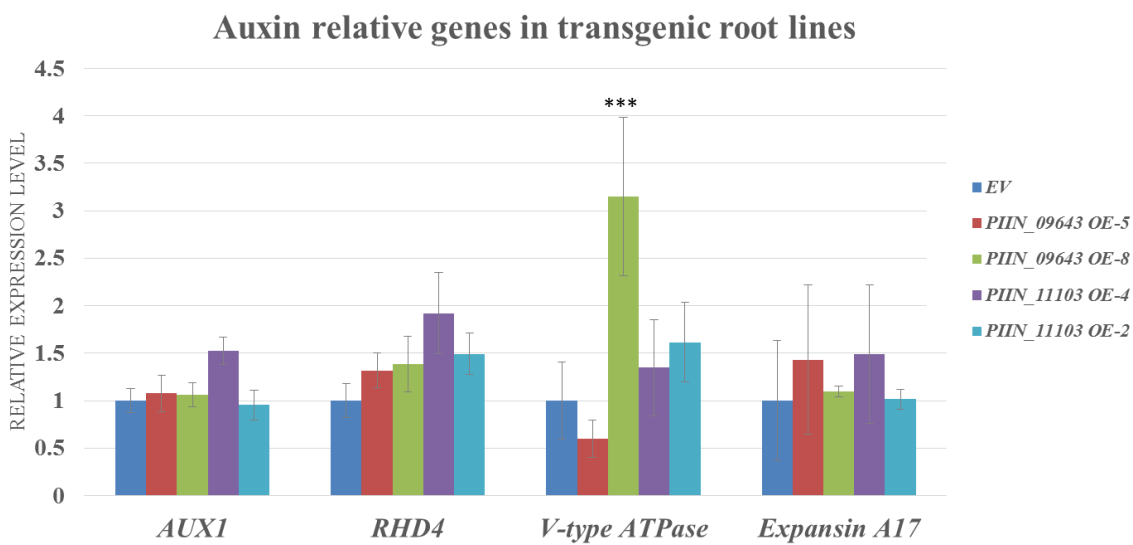
圖七、*PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 過表現於小白菜毛狀根系之基因表現分析

(A) 以 RT-PCR 檢測各個獨立毛狀根系中是否表現 BaR 基因與效應蛋白候選基因。以 q-PCR 檢測 (B) *PIIN\_09643 OE-5* 與 *PIIN\_09643 OE-8* 轉殖毛狀根系中 *PIIN\_09643* 之表現量；(C) *PIIN\_11103 OE-2* 與 *PIIN\_11103 OE-5* 轉殖毛狀根系中 *PIIN\_11103* 之表現量。*Actin* 為 internal control。N.D：not detected。



圖八、*PIIN\_09643* 與 *PIIN\_11103* 過表現於小白菜毛狀根系之蛋白表現分析

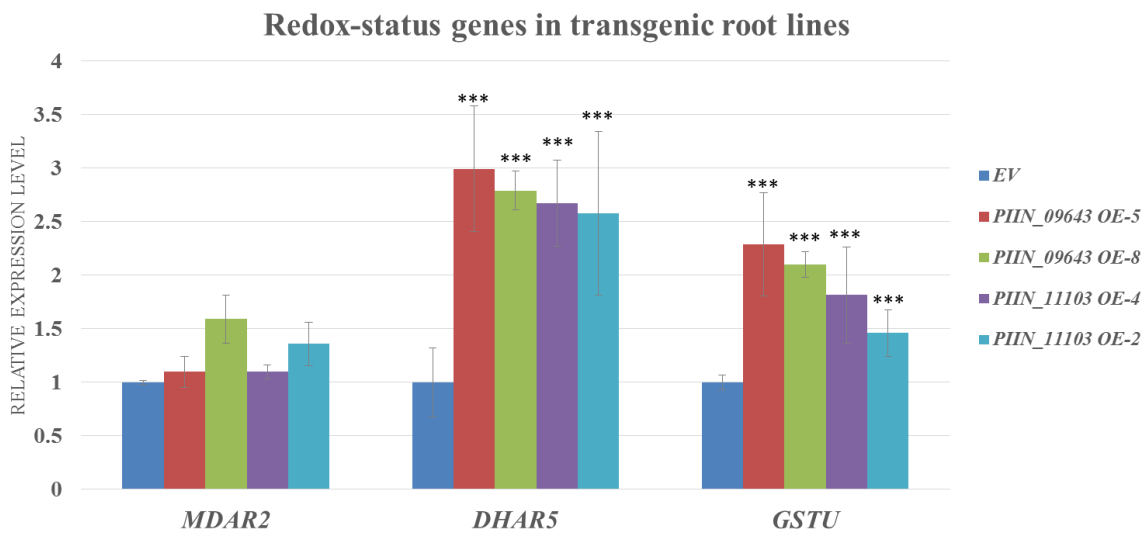
以 western blot 檢測各個獨立毛狀根系中是否表現候選效應蛋白。Anti-HA：取 15  $\mu\text{g}$  蛋白質以一級抗體辨認重組蛋白上 HA tag 後進行 western blot 實驗之膠圖。CB：取 15  $\mu\text{g}$  蛋白質跑 SDS-PAGE 後以 Coomassie blue G250 染色之膠圖。



圖九、生長素反應相關基因於候選基因過表達之毛狀根系中之基因表現分析

以 q-PCR 檢測候選基因毛狀根系中 *AUX1*、*RHD4*、*V-type ATPase* 與 *expansin A17* 之基因表現量。*Actin* 為 internal control。藍色方框：*EV*；紅色方框：*PIIN\_09643 OE-5*；綠色方框：*PIIN\_09643 OE-5*；紫色方框：*PIIN\_11103 OE-4*；青色方框：*PIIN\_11103 OE-2*。\*：p value<0.1；\*\*：p value<0.01；\*\*\*：p value<0.001。





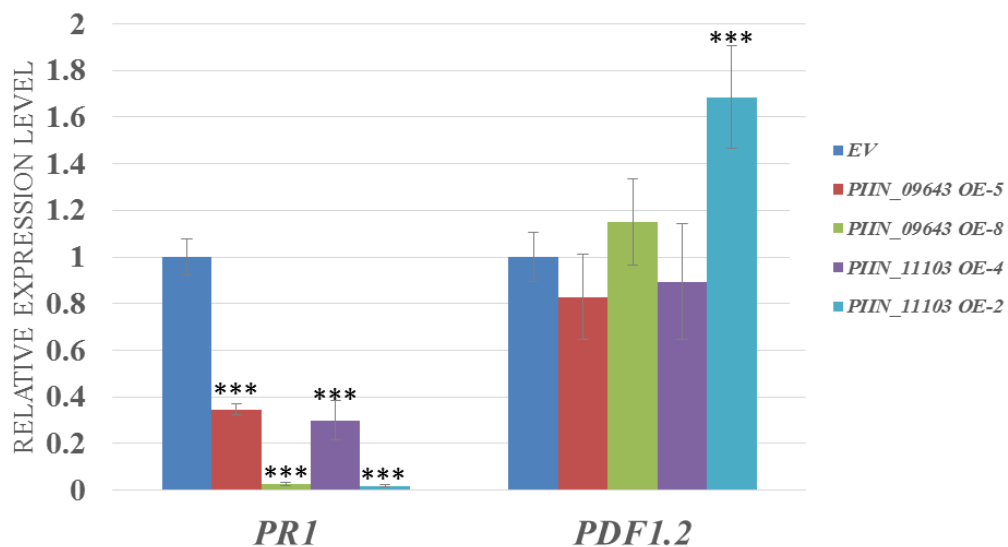
圖十、氧化還原狀態相關基因在候選基因毛狀根系中之基因表現分析

以 q-PCR 檢測候選基因毛狀根系中 *MDAR2*、*DHAR5* 與 *GSTU* 之基因表現量。*Actin* 為 internal control。藍色方框：*EV*；紅色方框：*PIIN\_09643 OE-5*；綠色方框：*PIIN\_09643 OE-5*；紫色方框：*PIIN\_11103 OE-4*；青色方框：*PIIN\_11103 OE-2*。

\*：p value<0.1；\*\*：p value<0.01；\*\*\*：p value<0.001。

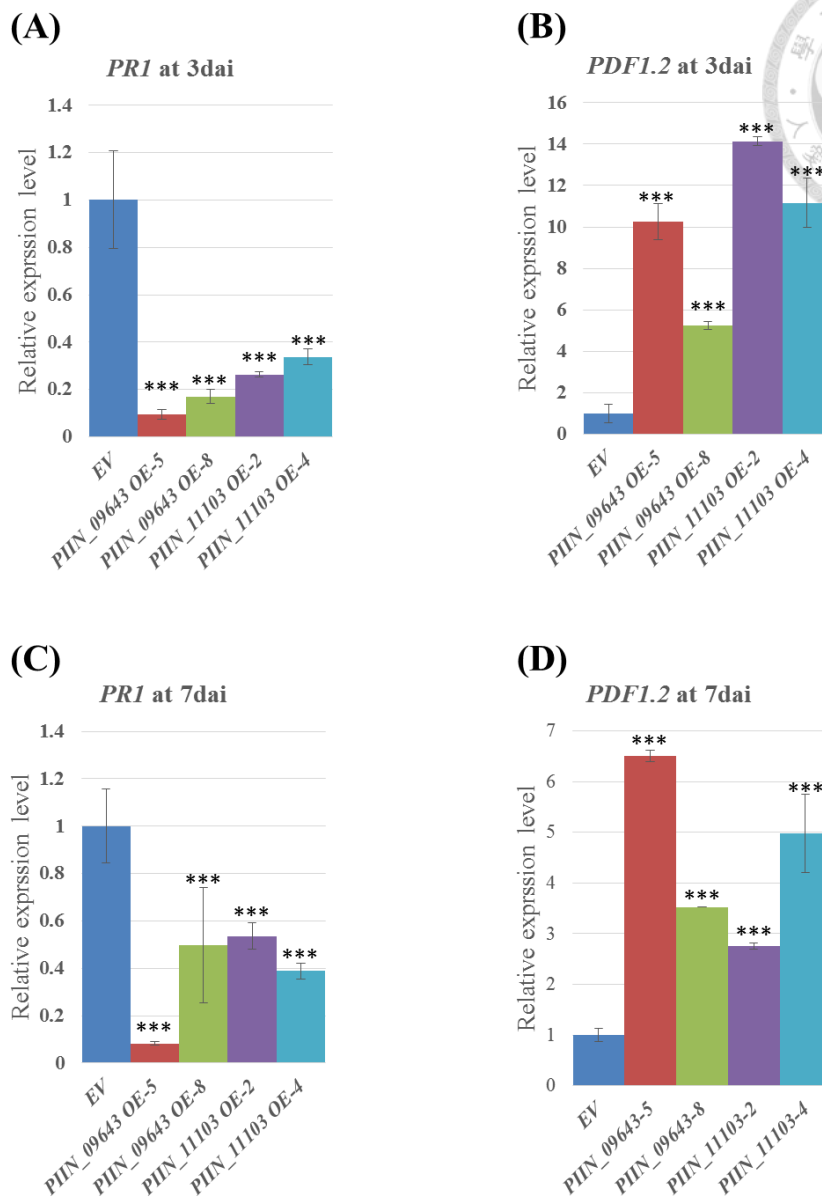


### PTI response relative defense genes in Transgenic root lines



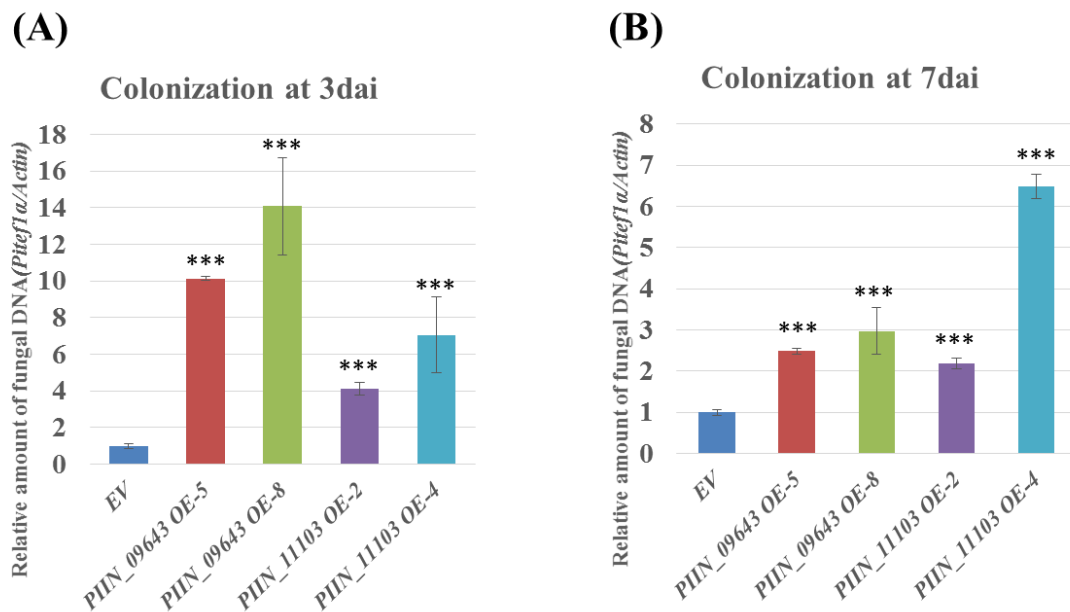
圖十一、植物 PTI 反應防禦基因在候選基因毛狀根系中之基因表現分析

以 q-PCR 檢測候選基因毛狀根系中 *PR1* 與 *PDF1.2* 之基因表現量。*Actin* 為 internal control。藍色方框：*EV*；紅色方框：*PIIN\_09643 OE-5*；綠色方框：*PIIN\_09643 OE-5*；紫色方框：*PIIN\_11103 OE-4*；青色方框：*PIIN\_11103 OE-2*。\*：p value<0.1；\*\*：p value<0.01；\*\*\*：p value<0.001。



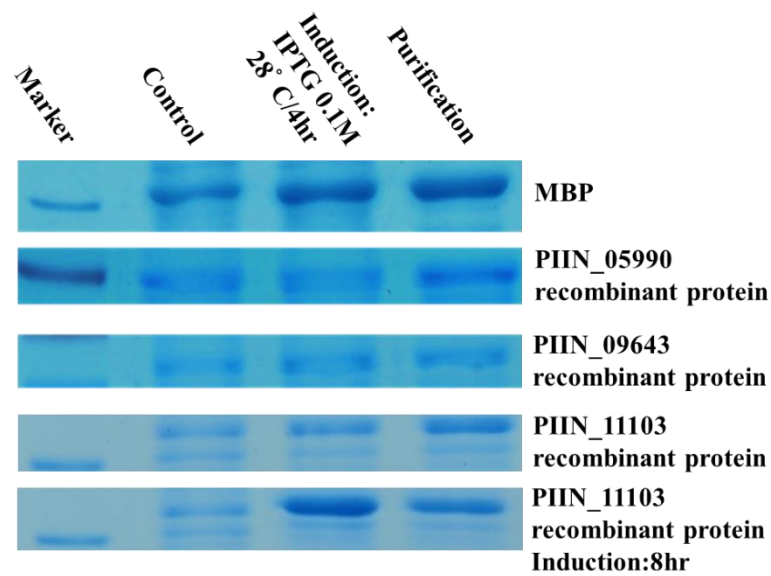
圖十二、 *P. indica* 共生時 PTI 反應相關基因在毛狀根系中之基因表現分析

以 q-PCR 檢測候選基因毛狀根系中 *PR1* 與 *PDF1.2* 之基因表現量。*Actin* 為 internal control。(A)接種 *P. indica* 三天後 *PR1* 之基因表現量；(B)接種 *P. indica* 三天後 *PDF1.2* 之基因表現量；(C)接種 *P. indica* 七天後 *PR1* 之基因表現量；(D)接種 *P. indica* 七天後 *PDF1.2* 之基因表現量。dai：days after inoculation。\*：p value<0.1；\*\*：p value<0.01；\*\*\*：p value<0.001。



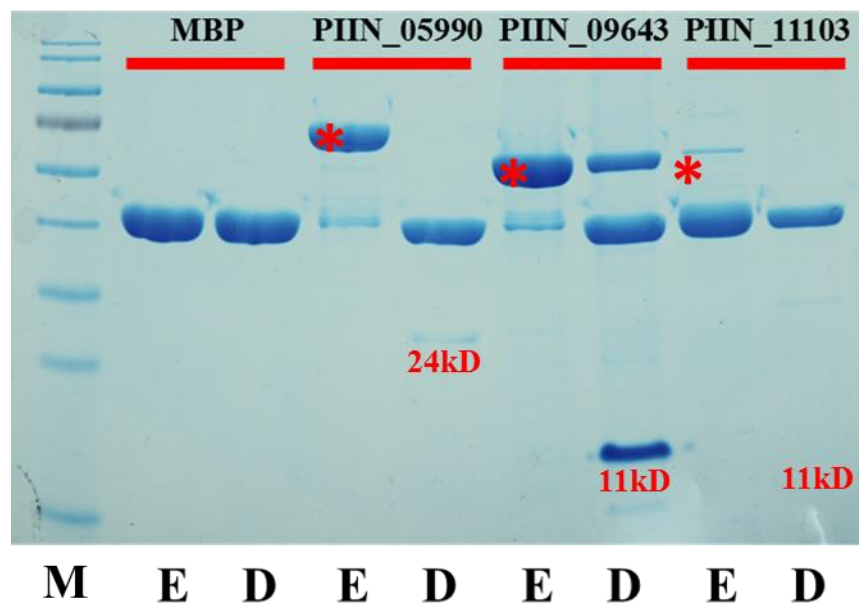
圖十三、*P. indica* 於候選基因毛狀根系中的共生效率

以 q-PCR 檢測 *P. indica* 在各個候選基因毛狀根系中的共生程度。(A)接種 *P. indica* 三天；(B)接種 *P. indica* 七天。dai：days after inoculation。\*：p value<0.1；\*\*：p value<0.01；\*\*\*：p value<0.001。



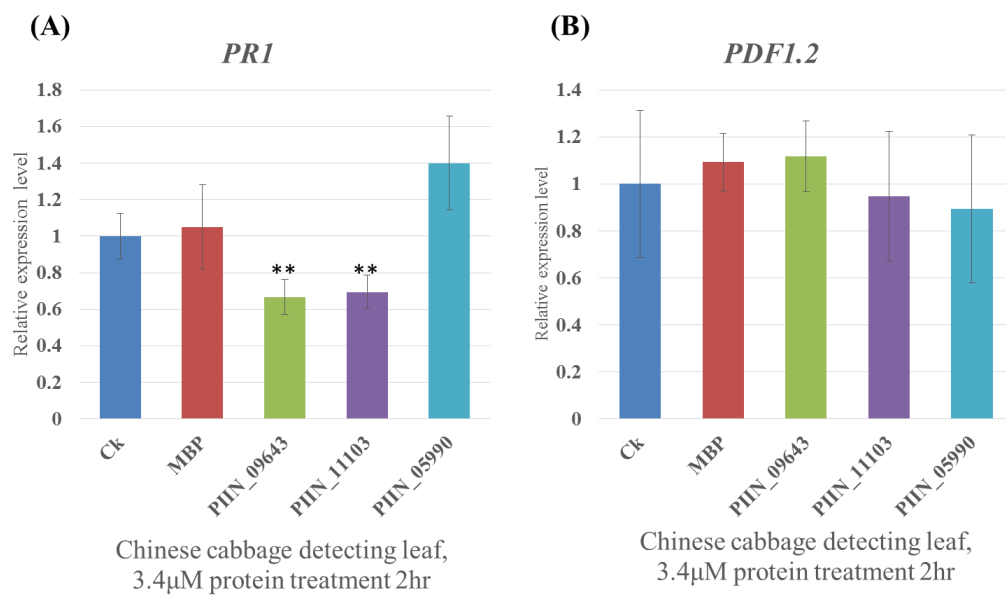
圖十四、候選基因純化蛋白系統的誘導純化

攝氏 28 度下以 0.1M IPTG 誘導四或八小時後所誘導與純化之蛋白量。各組別均取 3 $\mu$ g 總蛋白跑 SDS-PAGE。Control：不進行誘導；Induction：進行誘導；Purification：誘導後進行純化。MBP：半乳糖結合蛋白。



圖十五、半乳糖結合蛋白的切除

將純化的候選基因重組蛋白以 factor-XA 處理，獲得候選基因基因產物。\*：重組蛋白。MBP：半乳糖結合蛋白。M：protrin marker；E：純化(elution)；D：factor-XA digested。

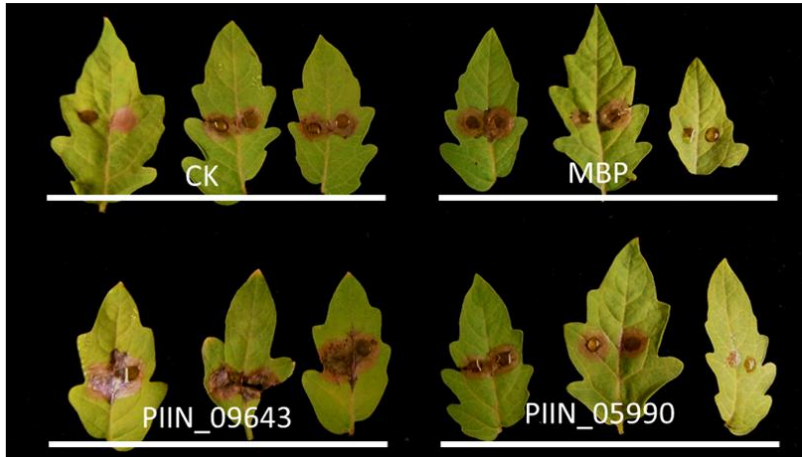


圖十六、候選基因重組蛋白對植物 PTI 反應防禦相關基因的影響

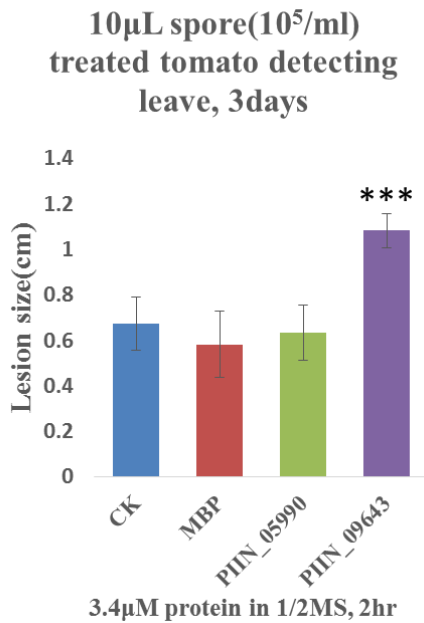
3.4μM 候選基因蛋白處理小白菜 detecting leaf 兩小時後以 q-PCR 檢測(A)*PR1*、(B)*PDF1.2* 的基因表現量。*Actin* 為 internal control。Ck：1/2MS；MBP：maltose binding protein。N=5。\*：p value<0.1；\*\*：p value<0.05；\*\*\*：p value<0.01。



(A)



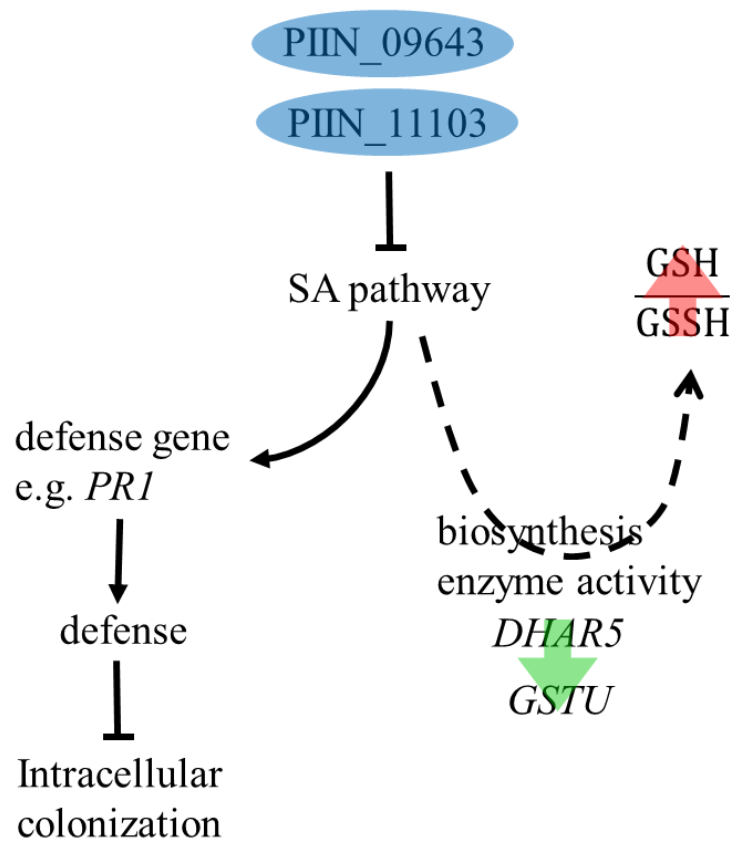
(B)



圖十七、候選基因 PIIN\_09643 蛋白對於病原菌致病力的影響

3.4 $\mu$ M 候選基因 PIIN\_09643 蛋白處理番茄 detecting leaf 兩小時後接種  $10^5$ /mL *Botrytis cinerea* 孢子 10 $\mu$ L，三天後測量病徵(cm) (A)表型；量化圖表。CK：1/2MS；MBP：半乳糖結合蛋白。N=6。\*：p value<0.1；\*\*：p value<0.01；\*\*\*：p value<0.001。





圖十八 PIIN\_09643 與 PIIN\_11103 於共生時可能扮演的角色與機制

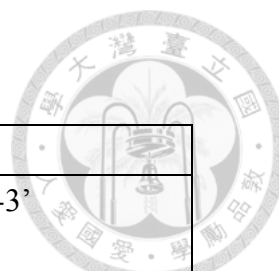
## 附錄



附表一、引子序列

小白菜基因表現量檢測引子	
Actin FP	5'-CTTTGATACAGCGGTGACATCCG-3'
Actin RP	5'-GCAACATACATGGCAGG-3'
BaR FP2	5'-ATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3'
BaR RP2	5'-GCACGGTCAACTTCCGTACCG-3'
BcAUX1 qPCR F	5'-TTTGCTGGTGATGATGC-3'
BcAUX1 qPCR R	5'-GCAACATACATGGCAGG-3'
BcPIN3 qPCR F	5'-GCCATTGGCCTAGCGGTTCC-3'
BcPIN3 qPCR R	5'-CGGGTAAGAACCCTGTTACAGGG-3'
BcEXPA17 qPCR F	5'-TTGGCCCAGAGCCATGGCC-3'
BcEXPA17 qPCR R	5GGCCCATTTGGCTTACAAGAA--3'
BcGSTU qPCR F	5'-CGTTAAGAACCTATGCCCGAC-3'
BcGSTU qPCR R	5'-CTTGAACCGGTTTTGACCCG-3'
BcRHD4 qPCR F	5'-CCCGGTCTAAGCAGCTTTGCGGC-3'
BcRHD4 qPCR R	5'-CGCTAAGCTTTCGCAACCGGAAAGGC-3'
BcVATPase qPCR F	5'-GGGGTTTTCGCTCCATTCATTC-3'
BcVATPase qPCR R	5'-GAACTTTACAAACCAAAGGAACAATGAG-3'
BcPR1 FP1	5'-GCAGACTCATACTCTGGTGGG-3'
BcPR1 RP1	5'-TGGTTCCACCATTGTTACACCTC-3'
BcPDF1.2 FP1	5'-GGCTAAGGTTGTTTCCATCATCACC-3'
BcPDF1.2 RP1	5'-AAGTAGCAGATACACCTGTGATATGGGA-3'

製備雙重扣減式 cDNA 基因庫使用引子	
cDNA synthesis primer	5'-TTTTGTACAAGCTT <sub>30</sub> N <sub>1</sub> N-3'
Adaptor 1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3'
PCR primer 1	5'-TCGAGCGGCCGCCCGG GCAGGTACCTGCCCGGD-3'
Nested PCR primer 1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGG CAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'
Adaptor 2R	5'-CTAATACGACTCACTATAGGG CAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'
Nested PCR primer 2R	5'-AGCGTGGTCGCGGCC GAGGTACCTCGGCCG-3'



印度梨型孢真菌基因釣取及表現量檢測引子	
PItef1 150f	5'-CATCGTCGCTGTCAACAAGATGG-3'
PItef1 150r	5'-CGACCGTCTTGGGGTTGTATCC-3'
PIIN_07104 FP	5'-ACGCTGTAAACCTCCAAATCCCC-3'
PIIN_07104 RP	5'-GTCGACATTGCTGCCTGTATTGCT-3'
PIIN_04526 FP2	5'-CATGACATACACCCAACCCCCGA-3'
PIIN_04526 RP3	5'-GGCAAAGAAGCCAGCGAGGAGAGCAGAA-3'
PIIN_02699 FP1	5'-GCCCTCGTCAAGCACGCGCCTACTGG-3'
PIIN_02699 RP1	5'-GATACGGACGGCTTGGTTGAAAGGGATG-3'
PIIN_02169 FP	5'-ATCCGTCAGTCATTTGAGCAGGG-3'
PIIN_02169 RP	5'-GTCACCATAAGGTGGCCTCAAGAAC-3'
PIIN_03013 FP1	5'-CGTTTCAACCTTTGGAACGCCGTC-3'
PIIN_03013 RP1	5'-GGGAACCCGTTGCGGACACGGTT-3'
PIIN_05767 RP1	5'-ATAAGGGACAATGTTTCCGAATTCATCG-3'
PIIN_05767 FP1	5'-TGTCCGTGGCGAGTACATGATCCC-3'
PIIN_05990 FP1	5'-ATGGATAACTTCATCTCGATGGCTCAGA-3'
PIIN_05990 RP1	5'-TGTGTGCGTCCGTGACATGCGTC-3'
PIIN_09643 FP1	5'-ATGCGCTTCGCCTTCTTTGCTATACTC-3'
PIIN_09643 RP1	5'-ATCCAACCTCGTCTATGCTTTGAACACTACG-3'
PIIN_11103 FP1	5'-ATGCGCTACTCCTTCATCGCCG-3'
PIIN_11103 RP1	5'-TCTGGGCACTGATGTGCTGGTCC-3'
PIIN_11103 RP2	5'-CTCTGCTCGGTCAATATGGTGGTTCG-3'
PIIN_11103 RP3	5'-TCACTCTGCTCGGTCAATATGGTGG-3'
PIIN_05990 RP3	5'-CTACTTGGTGAACCTGGGATGCCAT-3'

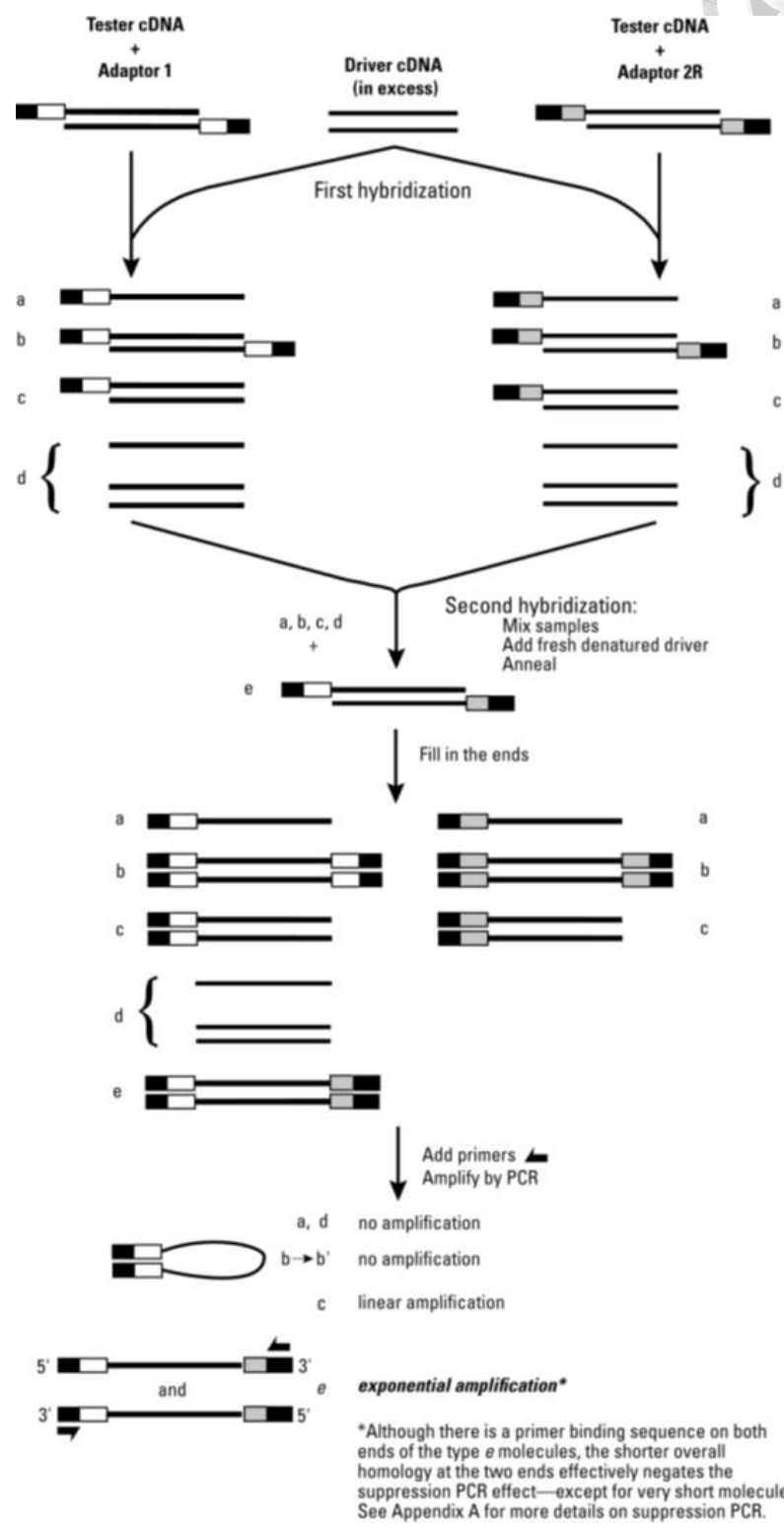
附表二、檢索表



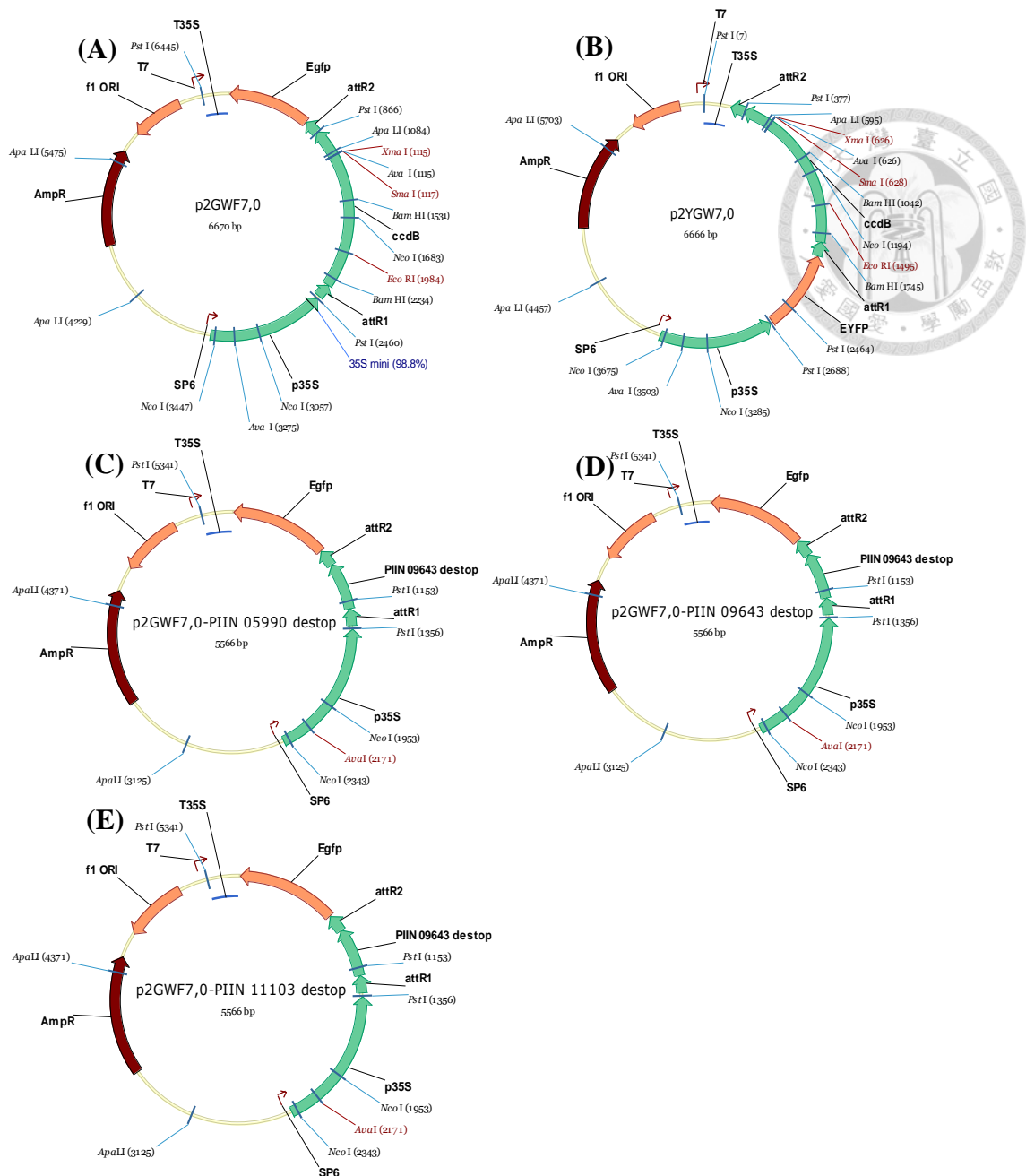
Nia2	Nitrate reductase2
PEG	Polyethylene glycol
POD	Peroxidase
SOD	Superoxide dismutase
CAT	Catalase
CAS	Ca <sup>2+</sup> -sensing
MDA	Malondialdehyde
APX	Ascorbate peroxidase
GR	Glutathione reductase
MDAR	Monodehydroascorbate reductase
DHAR	Dehydroascorbate reductase
ISR	Induced systemic resistance
PRR	Pattern recognition receptor
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
EF-Tu	Enlongation factor Tu
ROS	Reactive oxygen specie
PR protein	Pathogenesis-related protein
PTI	PAMP-triggered immunity
ETI	Effector-triggered immunity
MAPK	Mitogen activated protein kinase
FLS2	FLAGELLIN-SENSING 2
LRR-RLK	Leucine repeat receptor like kinase
BRI1	Brassinosteroid insensitive1



BAK	Brassinosteroid insensitive1 (BRI1)-associated
LysM	Lysin motif
RLK	Receptor like kinase
CERK1	Chitin elicitor receptor kinase 1
NB-LRR	Nucleotide binding leucine rich repeat
JA	Jasmonic acid
SA	Salicylic acid
MiSSP7	Mycorrhizal induced small secreted protein 7
SP7	Secreted protein 7
KF	Kaefer
MBP	Mannose binding protein

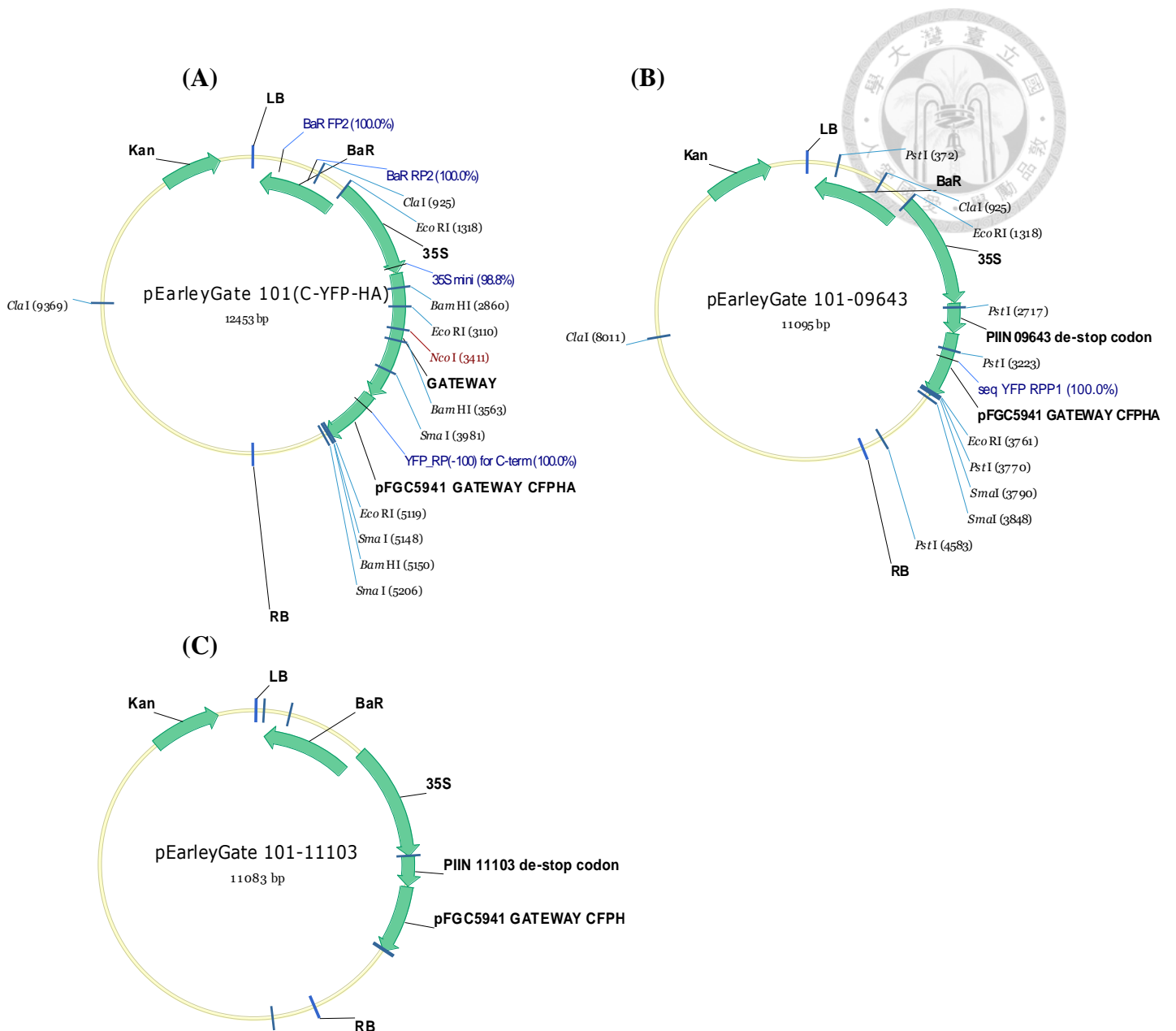


附錄圖一、雙重扣減式 cDNA 基因庫製備流程示意圖



附錄圖二、阿拉伯芥原生質體細胞次定位分析之載體構築

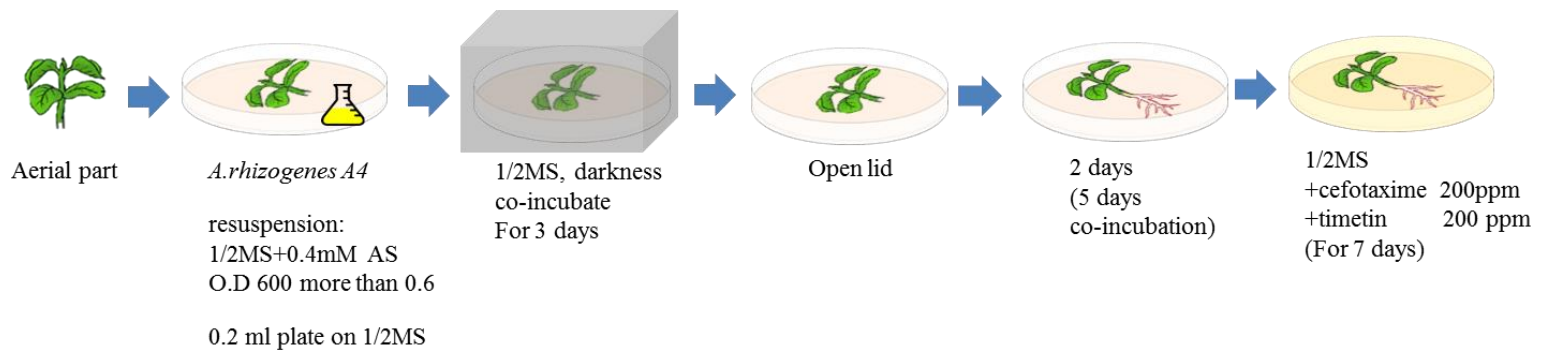
(A)p2GWF7 質體。(B)p2YGW7 質體。透過 gateway system 利用 PCR8/GW/TOPO 載體上之 attL1 和 attL2 與含有綠色螢光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的(A)p2GWF7 質體上之 attR1、attR2 進行序列互換原理，將去掉中止子之 *PIIN\_05990*、*PIIN\_09643*、*PIIN\_11103* 之開放閱讀框接入完成(C)*35S::PIIN\_05990-EGFP* 質體；(D)*35S::PIIN\_05990-EGFP* 質體；(E)*35S::PIIN\_05990-EGFP* 質體。可以在原生質體中以 35S 啟動子驅動候選基因蛋白與 EGFP 的融合產物。



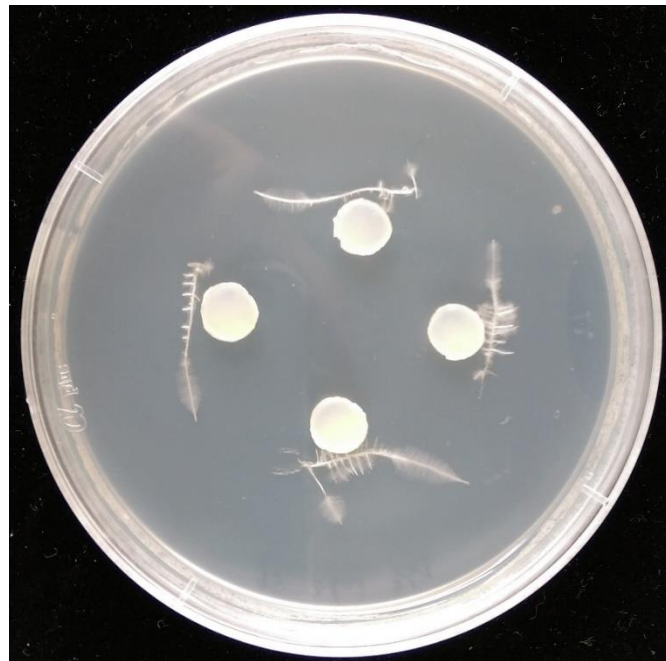
### 附錄圖三、轉殖毛狀根系使用載體構築

(A)pEarleyGate101 質體。透過 gateway system 利用 PCR8/GW/TOPO 質體上之 attL1 和 attL2 與(A)pEarleyGate101 上之 GATEWAY 序列進行序列互換原理，完成可以在小白菜毛狀根系中以 35S 啟動子驅動(B)PIIN\_09643-EYFP 和(C)PIIN\_11103-EYFP 融合蛋白產物之載體構築。

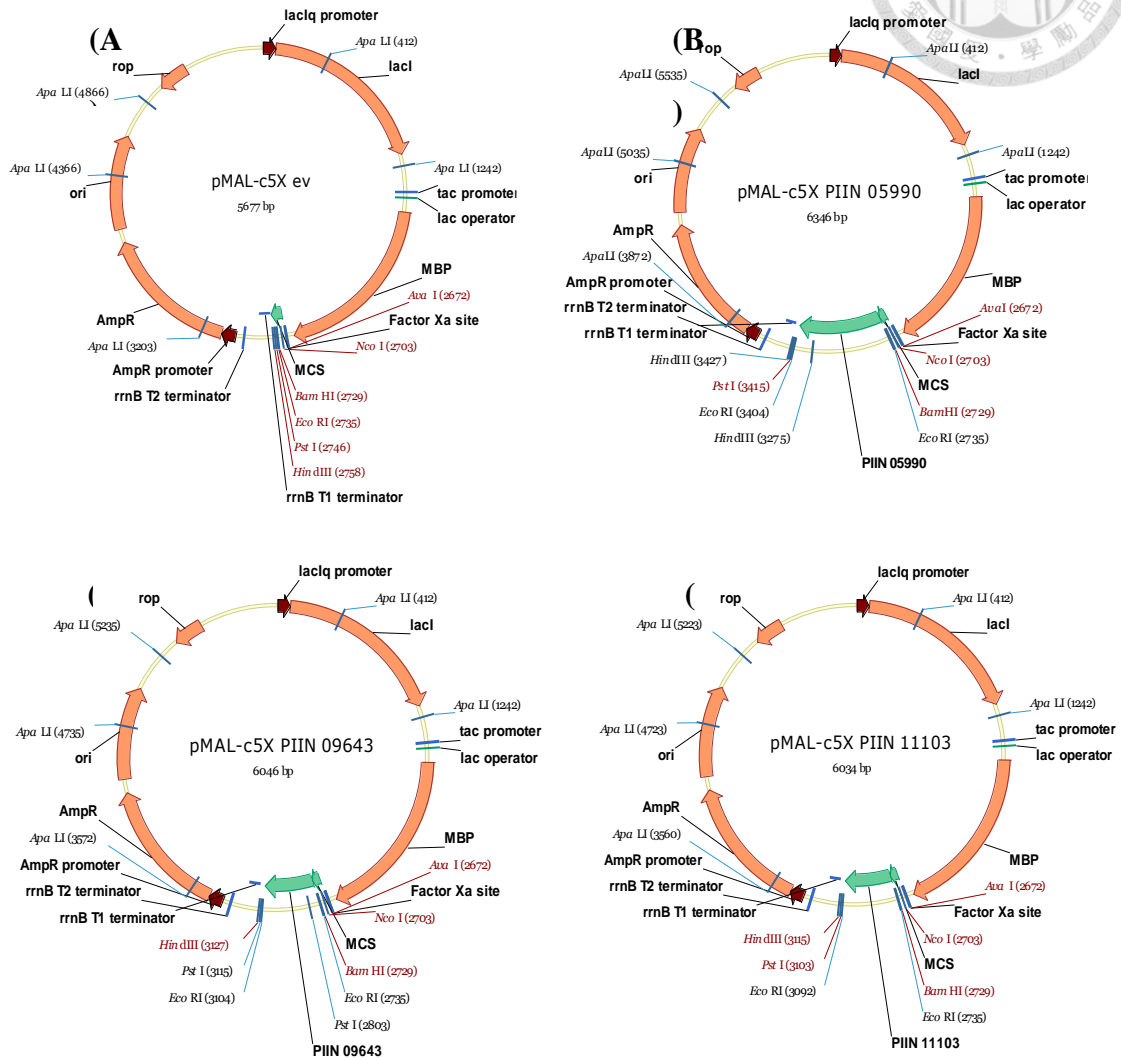
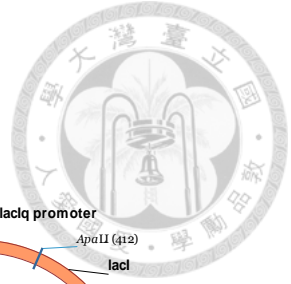




附錄圖四、以農根菌品系 A4 產生小白菜轉殖毛狀之流程示意圖

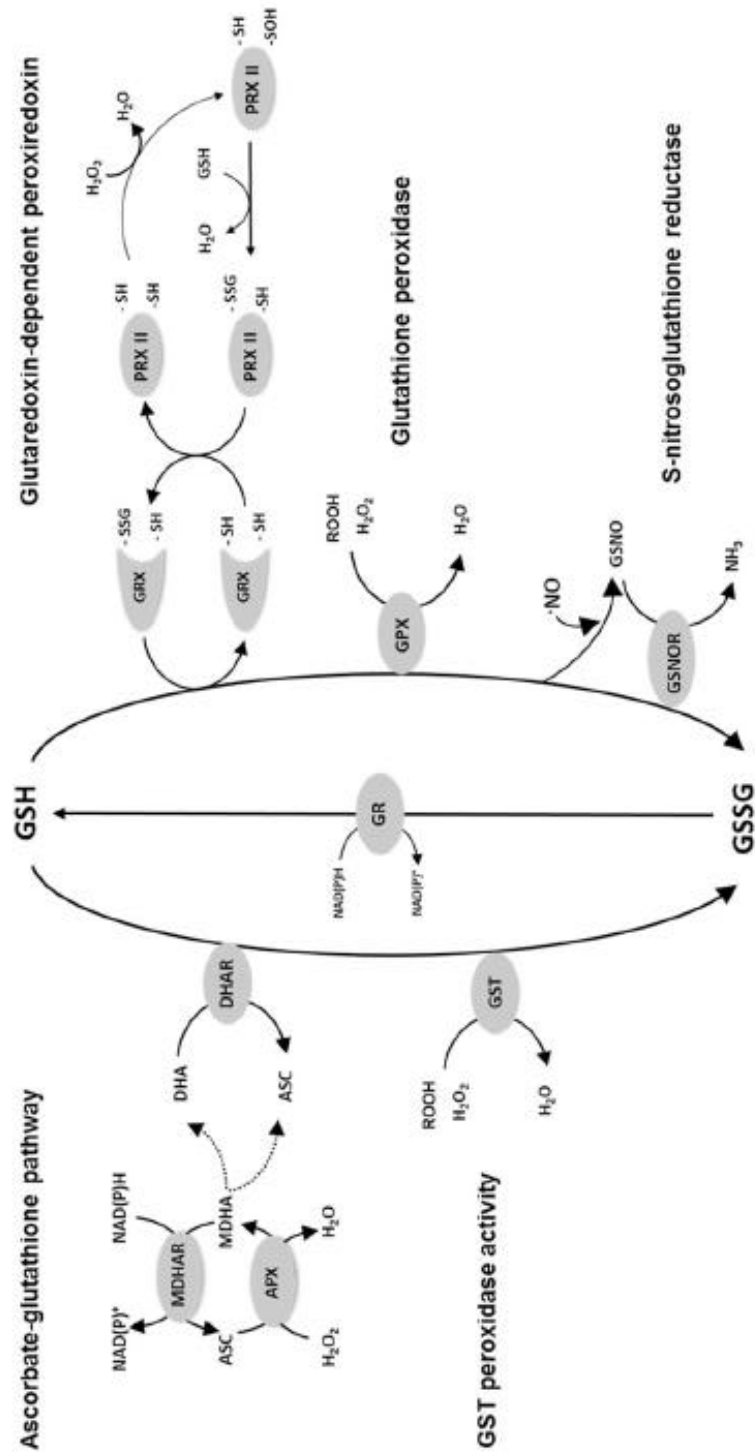


附錄圖五、檢測共生量時真菌接種之示意圖



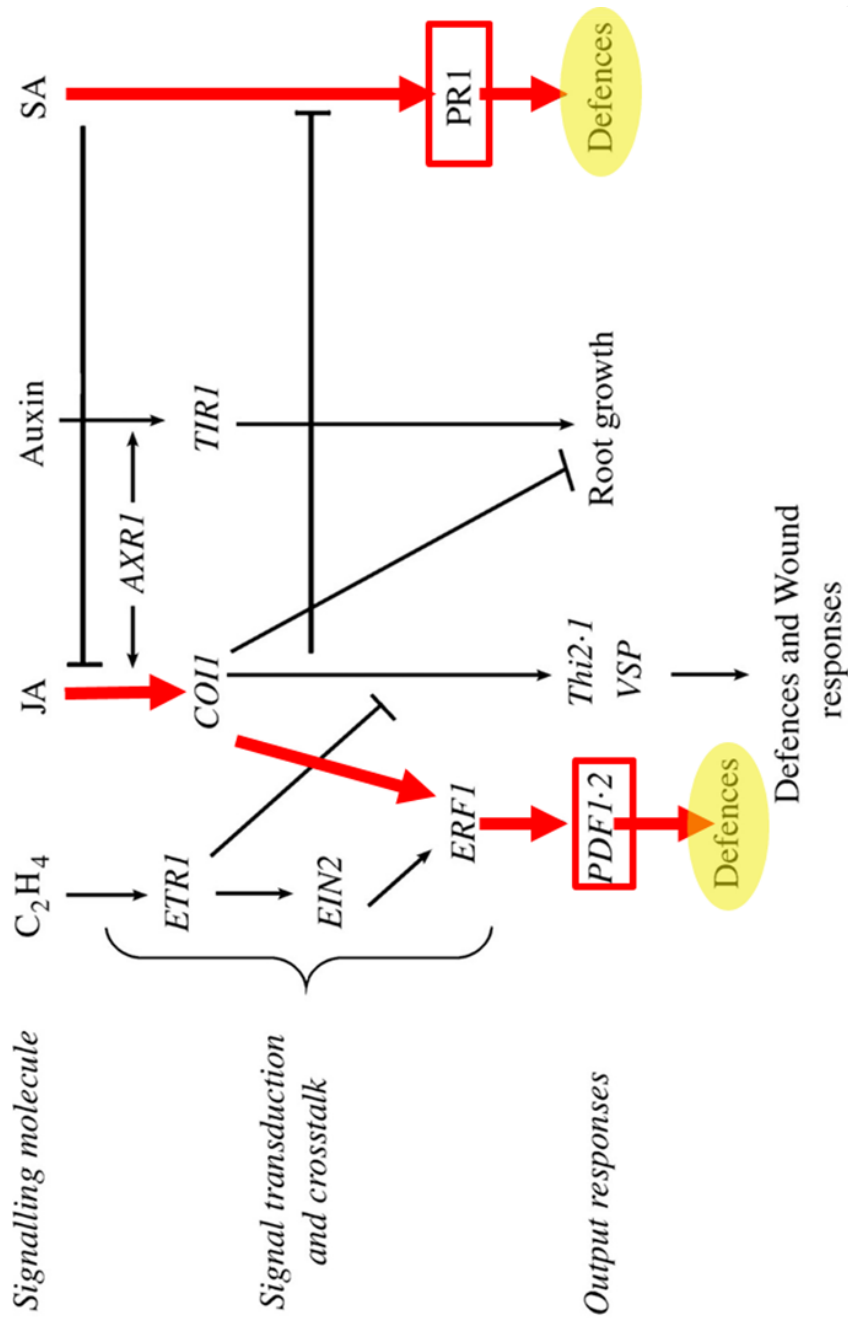
### 附錄圖六、候選基因純化蛋白系統使用載體

(A) pMALc5X 質體。以 EcoRI 切位將 *PIIN\_05990*、*PIIN\_09643*、*PIIN\_11103* 基因之開放閱讀框(open reading frame, ORF)全長片段接入 pMALc5X 上、IPTG 誘導的 Lac promoter 所驅動之半乳糖結合蛋白(MBP)與蛋白酶 factor-XA 切位之後，完成能夠表現候選基因純化蛋白的載體(B)pMALc5X-*PIIN\_05990*；(C)pMALc5X-*PIIN\_09643*；(D)pMALc5X-*PIIN\_11103*。



附錄圖七、植物體中 antioxidant recycling 示意圖

本圖為植物體中氧化還原物質與代謝酵素交互作用之示意圖，引用自 Noctor 等人 2013 的著作：Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? Figure 1.



ALESSANDRA DEVOTO, and JOHN G. TURNER Ann Bot  
2003;92:329-337  
©2003 by Oxford University Press



#### 附錄圖八、植物體內防禦反應路徑示意圖

本圖為植物防禦反應中各種植物激素路徑交互作用之簡單示意圖。修改自 ALESSANDRA DEVOTO, and JOHN G. TURNER Annals of Botany 2003;92:329-337. Figure 3。以紅色箭頭標示 SA 路徑與 JA 路徑調控的防禦反應途徑，PR1 為 SA 路徑標誌基因，PDF1.2 為 JA 路徑標誌基因。

候選基因序列：

以下以灰色表示 untranslated region 序列 (UTR)；紅色代表外顯子序列 (exon)；黑色代表內含子序列 (intron)。



**PIIN\_07104 :**

5'GCTAGCGGAGAGCAACGGTTGCTTTGTTCCCTCACCTTTGACCAAACCCG  
ACCTGTTTCGACATTTTCGTCGATCCTTTCTCTCTTTTCTCCAACACCTTCCTT  
TCACCTTCACTCCTTCTCACTTTCCGGGAAAGTAGACATTCCTTTTCGACCCTT  
CAAACACCCTTGATCACTTCAATTTTCGACAAATTTTCGCCAAATGATCAAA  
ATTTACGCCCTCGTGCTTTCAATTGCATCACTTGCATACTCTCTTCCAACACC  
AGATGACCTCCTTGCGCCCATCAAGCGGGCAGTCGATATTCCTGGAGCACTT  
GCGCCAAACCCACAGGCCTATGTTGTCGCTTTCAAGCCCAACACCGTAGATC  
CTACTGGACGTGGAGAATGGCTCAATAATGTGCTCTCGACCAGAGGTCACC  
GCCGACGTGACCTCTCCTCGTCCGACCTCAAGCTCAACTGGAACGAACTGT  
GTACAATGGCTTGGCTGGAACATTTAGTGACGCCGAGATACGTACGCTACG  
AAGACAAAACGAAGTCAAGTATATCCAGCACGGTGCGTCGTAACGACGACG  
CGAAGAGGGATAGCTAACACGTTTCTGTGACATAGATACATTACTCCATAC  
CAATGAACTCGTCGTACAGACCAATGCTGTATGGGGAATCGCTCGCCTTTTCG  
TCTGGCGGGAACCCTATCCCTTTTGGCTCGGACCCCTCGACGTTTAGTTTCTC  
CTACACTTTCGACAGCTCTGGTGGCAACGGCGTCGATATCTACGTCTTGAT  
ACAGGAGTCCGTGCTACACACCAGGACTTTGGCGGTTCGAGTCAACTTTCTCC  
AAACCTTTGGATCAGGAACGCCGGGCGTTGATGTAAACGGACGTACGTGCA  
CATTATGGCACACCAATACATGCGTATCTGACCTTGTATAGATGGCAGCCAT  
GTCTCTGGAACGTGCAATCGGGTCGGTATTCGGCGTCGCAAAGAGCGCCACG  
GTGCAAATGATCAAGTGCATGGCAGACGACGGGTCCGGATTCACTTCAGAC  
ATTGTGTCTGCCATCAATCTTGCAGCCAACTGCCGCAACCTCTGGTCGGC  
CCTCTGTCTGTCCATGTCGCTTGGTGGTCCAGCCAACGATGCCATTGACGA  
CGCTGTGATCAACGCTGTAAACCTCCAAATCCCCTTTGTCGTCGCGGCTGGC  
AATAACGGAGCGGATGCGTCAACGAGCTCGCCTGCGGAGACTCGGTGGGTCT  
GCTGGAAATCCGGGGGTGATTACGGTTGGCGCCACCACAATCGACGATACC  
TTTGCCACCTTTAGCAATACAGGCAGCAATGTCGACGTCCTTGCACCTGGCC  
AAGATATTCTCAGCTGTGGTATTACAGACGACGCGGGCGGTCAAGAACCTCT  
CAGGGACGAGCATGTCAACGTATGTGCTCCGAATTCTCCTTTTTTCATGCTAA  
TCTTGTTTCGACAGCCTCATGTCGCTGGTCTGGCTGCGCTCATCATGGGATTG  
GAAGGCAAGATCAGCCCGACCGCGCTCAAGCAGAAAATTATCGCTCAAAGC



GCACTCGGTGTCATAAGTGGACTCCCAGTGACTACTGTGAACACGTTGGCG  
 AACAAACGGAGCCACCGTGGTCTAGGGACGTGTTCCCTCAGGGAGGTATGCAG  
 GGTATCTATTGGGTGTGTTACAAGTTTTTTTATCCTTTACTATTTCAATATAAC  
 TTCTTTCCCGTTCAGTTAGCATCACATGAACTAGCCTCACAGGGAATCTCGG  
 ACGACCTCTTGCAGACGGATCAGAGCCCTGTCCGCATTTGCTCACTCTAAT  
 AGGATTAACCTTGCTAG3'

**PIIN\_04526 :**

5'GGGGTGGGAGTAGCCAAGCTCGCCGAGCCTGTGCGGCCTGCACTGACTTG  
 TACTTGGCCAATTGCCCGTCACATTGCTTATAAGGAGGTTTTTTTCCCCCG  
 AAGTCAAAGGTTGCTCTCTACCTTTTCTTTCCCTTTTGTGTCGGCGACAGTC  
 CAATAGGCCGTTTTTCCCGCCTTGTTCTCTCTCTCAACCAAT**ATGCTCAC**  
**GCTCCTCGGACCGCCCTCGTCTCCTTACCGCCGTCTTGCCCAAGGCGGC**  
**GCGTTTACCCCGCTCGCATCTCAGAGCTTACGTACACTGCACTCCCTTACC**  
**AGCCGACCCAAACACGGGTGAGCGTGGCCACCAGTACGGCTACAACATT**  
**GCAACTCGACG**GTGGGCATATTACCTACATATTTTCTAAAAGTATAGCTCAT  
 TCTCTATTAG**ACTCAGGGCCAAGAATCACTCTGCCAGACGGCCATTATCAAC**  
**AGCATTGACGACTTTTGCCTTTGGGGTCCCCCGAGCCCAACAGCTTGATCG**  
**GTGACACTGAAGGTGAAGCCGTTGCTTGGTGCACAAAAGGAGGTCACGGAA**  
**CTCGTGTCAATCCCGAGGGTGCCCTACCGGTGTCCAGTTTATGCGCACACC**  
**AGATTACATCCAAG**GTCCGCACCCAACCCTAAATCCTAGGCGTGTACTAAC  
 AACAAAAATATAG**TCACTGGTCATATTAGACAAGAGCGTATCAACATTGCT**  
**GCCGACGACTCTGGAGGAGAGATGGATCCCCACGGTGCCGACCAACGTGGC**  
**AACCCCTCGGTGGCTTGCTTCTCCAACGCCTGGGGTGGAGGATACGTCC**  
**AAGCTATCGAATGGCACAATTCATGGGTGGTGGCGTCTTCTGTCTCAAGGC**  
**CTGCGACCCAGGGGCCCAACGCTGCTCG**GTACGTCTCCTCCTACCATCTA  
 CATCCTTTTCTAACCTTAAAAAG**CTTCTGCGAACATATCTTTGATAGAATT**  
**GGATGCGCATAACGCCCCAGCTGCGTACGAGGACGGTGTGTTTCGAATCC**  
**TGCCTCGGCGAGAACCAAGACTTCCCGGTTTGTCTCTCCATGCTTTGTA**AA  
 AAAAATAGGATGATACTGACGAACAAATCAGGTATCTATACCTCGAATGGC  
 GTCGTCATGACATACACCAACCCCGAGTCGCTTGGTCCCATTAGCGTCC  
 GCCATATGAGCCACGCATTCCGGCAAGCTCTTCGTGCACACCCTACACGA  
 GCTCTGCACTCTACACAGACGCACCACCAGCCACTGGTGCCGCCGCCTCGTC  
 TTCGTCCACGACGAGCCGTGCTCGACCTCGACTCCACGCAGCACCGCGAC  
 GCGTTCGACGACGGTACTAGCGCAAGTGCTACGTGCACTCCAGGTGCTGG  
 ATTCGTTGGTGCATCTGTCAGCCTTTCTGCTCTCCTCGCTGGCTTCTTTGCCT  
 TTGCCGTCGCGCTCTGA**GATGCCCGCCCTTCTTTGTTGGTGATGATGGA**

CTTGGTTTAGTTGACTGAATACCTACTTATTCCACTCGTTTGCTCCCTCCCAA  
AATATACACGTTTATTCTATGTTGGTGTCTGTAAATCAAAGGACTTGACCT  
GAGCATCTCGACGGACATATGCGCCCAATGAAATATGTAGAGGCAAGCATG  
GATAATATG3'



**PIIN\_02699 :**

5'CTGTTCTGGTTCCTCCTCGTCCTCTTGCCTTCGAACGCGAGGTTGTCGTTTT  
CCCCGTCGTCGAAATCCGAATCTGCATCATCCTCGGATTCAGCATCTACTT  
TAACTTTTTCTGGGACCTCTTGTCCACTGAGATCAAGTCCAAGCGCGGCCAT  
GGTTGGAAACAAGCGGCGCCCTTTGTTTGTCTCTCTCCACCATCATGTCGCT  
CGTCCGCCACGCAGAAAGTGCCCAAGCGTTGGAACAAGTCTCACATCCAA  
GGCATCTGGTCTGGTTGTCATCGACTTTCATGCCGTCTGGTGC GCGCCTTGC  
CACGCAATCAGCCCTGTGGTAGACGCTTTCTCGAAATCGGTACATTTGGGCT  
CCATTCAACCTTGC GATTCTAACGTGGCTGCTACAGTACCCTCAGGTCACAT  
TTGTCAAAGTAGACACGGATAAACTTCAGGATGTTGCGCAGAAATATACAA  
TTAAAGGTCAGTGTCTGACAAATATGTGGATCTCTTCTAATCGGGTCCCAA  
TATCCAGCTATGCCTACGTTTCTGTTTCATCAAGAATAAAGCGGTCGTCGAAA  
CGATTCCGGGAGCAGACCAGGAGGGACTTCGTGCTGCCCTCGTCAAGCACG  
CGCCTACTGGGCAAGCCTCTACTTCTGGCTCTTCCGACTCTGACGTGTGTTG  
TGTCCAAAACCTTTGTCGGATTACATCTGATTCATATCTATAGATCTCACTCT  
TGGAGTTTATCGACCGTTCACAAGTAACTGCCTCAACGAATCAAGTAGTC  
ATACCCTCAAATCTATCCTTACTGGGCACTCCAGGAACACCTCTGCAGCTTA  
CTTGAGAGCGATACAGACGAGCAACTGCTGCTGAACATCCCTGTGCGTTC  
ATGATCTCATTCCCGCTGTAACATAAAACCGATAGTTCAACCAAGCCGTCGG  
TATCAAAGGAATATCTATAAAGACAGAGGAGAGTTCTCATGCACCAAAGCT  
CATCAAACCTCGTTGTGAATAATCCCAACCTTGGCTTTGAGAACGTGCAAGAC  
GCGGTCGAACCTCAAGTGGCCCAGGTGATCGAGCTAGACGAAGCTGCAACG  
TCTGAAGGAAAGATGATCCCCTTGAGATTTGTCCGGTTCCAATCTGTCCTCA  
GTCTCGGGGTCAGTACCATCTATCCATCTACATTTGTCAACATTAATAA  
GGGACAGATATTTGTATCGTCAAATCAAGGAGGCGAGGATGAAACACGTAT  
AAATTCATTGATATATTCGGACTACCGGGACAGTGAGTGTAATGTTGGGGT  
TGTAAGAGAGTGTTAACGGAAGAGATAGGACGAGTCGCGTTTCGGAACACTAC  
GACCACGAGAAGATCACTAGCCTAAGATAGTGGGTACCATAGCATGTATCG  
CTTGCGCTCCTCTTCGGTCCCTCGAACCGGAAATAGATCCTTTTCAGGTCTT  
TGAATCCTTCCGCCCTGGCCGGCTCTTCGAATCGACCCTGAATATCTTTAAA  
GTCTTTACAAGGGATCAACTTTGAATCTCCCTGAGATAGCGTGAGTGAGATG  
ATGTGGTGAGCC3'





**PIIN\_02169 :**

5'GTCCCCCACTACTGAGGCGAGTTGACTGAATGCCGGTCAGGGACCTTCCG  
CTCCGAGCGAAGACCACACCTGTCCGGCACCTGGACCAAACAACGCCAGAG  
CTTTGGTCTTCCCCACGTCGTCTATATATCAGACGGCTTCCACTCTTCTTGT  
TCTTCTCTCCTTCCCTCTCTACGCTCCCTCTAATATCCGCCAACCATGTTCC  
CCGCCTCGTTTGTTCGCCTTTGTTCGCTGCTGCCCTCGTTGTACGCGCTGCTCCG  
CTCGAGAAAAGGGTCTCGCACAGGTCATAAGCAACTGTAATCACGACTTT  
GCGTATACTTGGTCTGTCTCCGTCTGTCTTTAATTAGCCCGTTGTTGACCTTC  
TGCAGGGACGATGTGAGTTCGACTTCTGACGTTTCAGTCCGCCCTAACTAGTA  
CTTTTTTTTGTGCAAATTTATAGGGACCATACAGTAAGTAAATAAATAAAT  
CGTATCTCTAAGAATATTGACTGATTCCCTCCAGCCGCCATCGTGACATT  
AACAGTGCCTTTAACCGAAACAACGGAAAGACTACCTTTTTTATGAATGGC  
GACAACTGGTCGTGCATCTACAACGAAGATAATGTCCAAGCCATCCGTCAG  
TCATTTGAGCAGGGACACATGCTCGCCTCGCACACCATTAGCCTCCTTCCTC  
TTTACAACATTCAGTCCAGCTAACATAGAACAGTGGTTCACATGCCACCTCA  
CCCAACTCAGTGATGCCCAAATTGACTACGAGATCCAGCGCCTCGACGAAG  
CCTTTGTCAAGATTGTGGGTGTCATTCCAAAGTTCTTGAGGTA ACTACAAA  
ATTTACCACTAAATCTCTTACTAAACCAACATTTTAGGCCACCTTATGGTGA  
CATCGACGAGCGGACCGCGTCGTACATCCAGCAAAAGCACGGCAAGACCAT  
TGTCTCTGGTCAGACGATTCTGGAGACTCGACCGGCGGCTCAACCCAGCA  
GTCAATCAATTTCTATAATACATTTGCGAATGAGAACCCCAAGCGTCCTCAT  
ATGGCGCTCTCACATGAGACTGAGCCATCGGGTTACAACGCCATGTA CTG  
GGTACCGTCGACA ACTTGGCCAGCCACGGCGTCCA ACTCGTTACGGTAGCT  
CAATGCCTCGATACTGATGCGTATATCTATGTTGGCGGATACCAGCAGCGTG  
ACTCGTCCTGGTACTGCGGTGGTTCATGGACACCGTCACCTGGTGGAGGAA  
CGTGTGTGCAAACATACTTCCAAGGTCGGTGATACATGCGCAAGCATTG  
AAAGCCAGTTTGGCCTTCCATCCGGCTCGATCTTAGCAGCCA ACTCTTTCTT  
GAACTGCAACGATATCTGTAAGCCTCTTCCTTGCTCTCCATCAGTTCATCCT  
AGCTGACCTGTGCCAGGGGTGAACACGCCAATCTGCATTCTCGAGGAGGC  
ACGACGACA ACTCGAACTTCGACCACGAGCCCCTCAACTACTCGAACTAGC  
ACGAGCTCGACGCTGCGCCGACCTGCGTTCAGACGTACACCTCCAAGGCC  
GGTGACACATGTGCGAGCATCGAGGGTCAGTTCGGCCTCCAGTCTGGCTCA  
ATCTTGGCTGCCAACTCGTTCTTGA ACTGCCAAGATATTTGTACGTCTATTC  
ATGTTTCATGGTTTCCGAAAACGATGCTCATTCTTCGCTAGGGGTGAACACGC  
CAATTTGTATCCCTCCCGGAGGCTCAACGACGACCCGTACTACTACGACGCC  
TACAAGCACCAGCACCAGTGGACCTGCACCGACCTGCGTCTCTACGTACAC

TGCCGTCGCCGGTGATACCTGCGCGAAGATTGAGTACAACCTATGAGCTACC  
GGCAGGCTCGATCCAAGCTGCTAACCCATCTTGGCTCAATTGTGCGGATATC  
TGTATGTGTTTACTCATTAAACTGCACGCATTTTGACCCTCTGTAGGGGCT  
TACACGCCAATCTGCATTCTCCTGGCGGATCGGGATGCACCCTCAAGATCT  
CTACGGCTTCGACTGACAGGACTTGTGCAGCTGTGGCTTCTCGCTATGGAAC  
CACGGCCGCTCTGATTCAAGCCTGGTAAGTCTCTCGCGGGTTTGATTCCGAC  
TTTGCTCATCTGCTTGCAGGAATCCAAGCTGGCTCAACTGCAATGATGTGTG  
GCCAACACCCCGCTTTGTGTGAGACACTAA TCGCTACCTGCCATTCGTGAC  
TCTTTATGGACACTTTTCTTGCTTCTTGCCAAACTCCAAGAGACGCCTCACT  
TATTC AATTCAACCAATGCTCCAAACCAACCCCTACGAGAGGCCAAAATGC  
TCTCTCTTCCACTCGTCCTATCCGGACACGCCACTCATTTAATCTACTACTCG  
AACTGAACCATATGATCCTATA3'

**PIIN\_03013 :**

5'GCTTTACCCAAAGTAAATTCCTGATAAATATAAATCCAAGGCAGTGCTT  
GAGGGGCCCTCGCCGTGCCAAAGCCGGTCCCAGAGCTGACCGACTGTCATA  
AATCGCTTATAACCCAGACTTGGACTCTGCGAGCTCCTTCCGCTCCCTTTGA  
CCTTTACTACTCTACAGTTTCTACGACTAGCAATTCCTCTTTCAGCATGTCT  
TTTCATCTTCGACTCGCCGCAACCGCACTTTTGGGCCTCCTTCCGCTCACAA  
ACGCCGCTACAATCTCGCCAGAGAGTATAAAGGGCAAATTTCTTCTCTGC  
ATGGGATTATTATGGAAAATATGACAATTTGACAAATGGTCCGTGCGCTGG  
CTTCCCCTATTTTTGGCCCACGGGCGCTCACCCATTCGCAGGCGACGTTAT  
TTGGGTGAACCAATCGGTGCGCGTCAGCAACCCTCAGCTCACCTACATCAAC  
TCTGCGGGGAATGCAATTATCAAAGTCGATGATACGACGACAGTACCCTAC  
AACGAAAAGCGCAACTCTGTCCGCTTGACCTCGCTCGACAAATTCAACCTC  
GGGACCGTCATGGTTTTTCGACGCTCTCCATGTTCCCTTATGGATGCTCAGTTT  
GGGGTGCTCTCTGGAGTCAAGGAATCAATTGGCCGGCTGGGTTAGTCCCC  
GAAACCACGATTAATAGTGCTTCTGAACTGACTCCGTTCTTTCTAGGGTGT  
AAGTGCTGCGTGCTGGTGATTGCCGCATGATACGATTACTGACTGTCCCGGT  
ATGGAATAGGAAATCGACATCTTTGAAGGCACGTTATTTCTAGCCTTATTCA  
CCACGTCACTTACCCATTCCTTTAGCCGTAAATCTCATGACCGCAAATCAGA  
TGGCTCTACATAACCGAATCGGGCTGTGCACAGGCTGACGGTGTGACCCAGA  
CGGGGATTACCCAGGTGAGTCGGGATGCGTCTAGGCCGATGGAAAAAAGTG  
TTCTCAAACCAGTCCCATCCAGGTTAAGAACTGTGACAATAACGGTAGTAA  
TGGTGCCGGCTGCACGGTTCTCGATGCCAACCAATTCGTATGGAGAACC  
GTTTGCGGCGGCTGGTGGCGGCGTGTGGGTCACCGAATTTGCCAAGACTGG  
GATCAACATCTGGTTCTTCAGCCGTGCTAATGTCCCTGCTTCGCTCTCTACTG

ACACCATTGACGTTTCAACCTTTGGAACGCCGTCTGCCAGCTACCTGCCTC  
GTCTTGCGACCCAGCCA GTACGTATTCGACCTTTTTAAAATATCTAACAGCG  
CTCATCTCCCTTGCAATAGAATACTTTAGTGAGCAGCAAATCGTCATCGATA  
TTACCCTATGCGGTGATTGGAGTGGTGTAAAGAGTGTGTTGGAGTCGACTTG  
CCCTGCCCTCAACGGTACCAACACATGCTATACGACCTACGTCTTGGATCCC  
AAAACTACGTCAACGCTTACTTTGAGCTGGCGTCAGTCAAGATCTTTGCCT  
CTGATCCCTCGGCCGTCGTCACCGCTGCCGGTGTGACACAAACCGTGTCCGC  
AACGGGTTCCCCACACCCAAACGCTGCCTCTGGCATGGGCCCGACGGGGGC  
GGTCGCGTTTGGCGCTTTTGGCGTTACCGCGATGCTCGGCCTGGTTCTGCAG  
TTTTAAGACGGTGTTTTACGGACCAGACTCGGTTTTCAATAGTTCCTGCAT  
AGATATGATATGTCGCTCTAGTCCTGTTCCCTTAGCTAGTCCCGATGGACGCC  
ATTCATTGATCTAGTGTCCCATCTGATATTGAGACCTTGTTAGACTTTAGA  
AATCGTGATATTGGCAGGCACTGACGCAGGAACGCAGTGTTCACATTAT3'

**PIIN\_05767 :**

5'TTTGAACCCGCCACAACACTCGTTTTTCTACCAGGTCCCCCGGAGGATCG  
ATTCTCTTTCTTTTTTCCCAAACCCATCTTTCAAGTGCTACTCATCGCTCAGG  
CCAGCAGGACCAGCCTCTAGTTTTCTGCTCTTTTTTTCAGCAAAAATCCCTTCTC  
TTCCAATCGATATCATCACTCTATCACTCTCTTTGAACCGAAAATGATGTTT  
AAGACTGTCTTTTGTCTATTGCTGCCGCCCTTGTTGGCTCCGTCACCGCTCT  
CCCGACCCAGACAGGGAAGTCCGCTTTGCCGTTTCGGTGTGTATTCTTTCT  
CGAGTGTTACGGTCATACTGACTTGTGTAGGGATGTCCAAGTCATGTTTCGTC  
GTTACCACTTCTCAAGGCCGAGTTACTGACCTTTATTTAGTGGCGTTTCGCT  
CCATCCCCGTCCAAGCTCCTGAAGTGTGAGTCTCTTGACTTTCATGGTA  
TGTCATATAACTCATCTTTGCCTAGTGTCCGTGGCGAGTCAGTATTACGTTCT  
TCCAAACGCGACAACCTTTGCTCATGTAATATAGGTACATGATCCCCGTCGAG  
AAGCGACAGATCCCAGAAGAGGTTCCAGTTCGAGCCACCAATGGTCAAATC  
ACGGCTATCAAGCGTCAGACCGCAGAGGAGGATCCCGTTACCACCGAGTAT  
GTCCAACCTTTGATTGAATATCATCAATCTAACGCGTTGTGCAGTAATAATG  
GCAACGTGATTCCGTACGTCAAGCGTGAGCCTCAAGGAAACATCCCCGCCG  
AAATTGCCGTTACCACCGAGTATGTCGCTCTTGATGCTTGAAAGAATATGCA  
CGCTAACATTATGTAGCGGTTCCGGTAACATTATCCCATACGGCAAGGTCA  
AGCGTGAGGCAGAGCCCCAAAAGTTTATCCCTCTCGAACTCGCTGTGAGGA  
CCGAGTAAGCGTTCGAAAATGACATCCATGGGTAATCTCTAACATCCTCTAG  
TGAATTCGGAAACATTGTCCCTTATTAGACGCATTCGTTTTTCGTTGCCTCAC  
ACTGCTCAGCGGGGCTGATGGTGTGTTTCTATCGTGTTTTTGCTGAAATCTG  
CGTAGTACTTTAAGACTCCCTACCGCTCCGCTTCTTTCTTTCCCTTAGCACATT

GTAGCTAGCCCCACTTATTCACCTCGTTGGGCGGGCACATATCGTGAAGGAGTA  
AAGATTAGACAAAGGCCTT3'



**PIIN\_05990 :**

5'CTCAAAGTGAATGGTTCGAGTGAGCCGATCGGGCAGTCCGGCAGGTCCACA  
AGGAGATGTATAAAAATAGCTATCGAATATTTATAATCTCTTTATTTTATCC  
AAGGCACATAACAAAACAGACATTCTCCGTACATTTAGCCACGGCGTAATG  
GACCTGCCGCAACTTGGAACCTTGACCTTTATCTACCGGCTGATTACC**ATGGT**  
**TAGTACAAGGATCATGACGACCTCGAGCTCATGATATCTCTTAGGATAACTT**  
**CATCTCGATGGCTCAGAAAGGCTACGCCGCCTACACCGCATCCCAAGGCCA**  
**TCAGACTCCACAGACGGAGCAGTATCAAGGAGATCAGAGCCAGCAACAAA**  
**GCCAAGGAACCCTTCCAGGCATGTCTACTTCTCCGCACAAAGATTCTCTAA**  
**CACGCTTCAGTCGACCACCACCAAGCAACACAGATCGCAAACAGCTCATCG**  
**GGAAGCTCAGGAAACAGCGAATTGTTCTCTCAAGCAATGGCATTCTTAAGC**  
**GGCGTACGTATTCTCTTCCATTCCGTTGCGCTGACGTCGTTTTCAAGGGA**  
**ACTACTCGACACCAGTCAACGAGACGCATGTCACGGACGCACACAAAGAG**  
**GTCTATGACAAAGGAAACGGCTCCAATGTCGATGCATCGTCCATCGGGAGT**  
**GCTGCGGGCGTTCAAGTCTCAAATCATTGTCCTCGCAAGGCAACAACA**  
**GCGACGGCAGTACCGCACATTCTGGAGGAGATTTCCAGACGAAGATGATAG**  
**GAATGGCAATGTCAGAGGCTGCGACCATGTTTGACAAGACTGGCAATTCCG**  
**GGGACAAGCAAGACGCCGTCAACGGTGCGGCTGCGACCATGTTCAAGCTTT**  
**TAGTGCAATCCAAGTTGAGCGGAAGTGCCAAAGGAAGCGACCTTACGAGCC**  
**TTATGGGTGGCAGCAATAGCGGCGGGTTGGGCCAGCTTTTGAACATGGTGA**  
**GCAGCCACGAGTGGTCAGAGCCCTTTGAAACTGACACCCCAACAGGCATCC**  
**CAGTTCACCAAGTAGATAGTCAGTAGCAGTGTGAAATGCGAATGATCATCT**  
**ATTTATGGCATGGAGAAAATGAGCCAGTCCCTATCTGTCCCCAGTGGATAG**  
**ACATATTCACTGAGAAGAAATGCGGCGAATGCTTTGAGCATCCACGCAGAG**  
**AGCACGACAAAGGCCGCTGCTGCCGATTATCATCGAGTATGACTGTGCTG**  
**AAAGTTAAGGC3'**

**PIIN\_09643 :**

5'CTTGCAACGTATTTCCCATAGATTGTAATCATTCCAATGCCAGAGCTCGGA  
TGATAAAGTCTATTGACTCTCGAAAGGTATAAATGGCCTCTCCTTGCCGTC  
GAAACTCTCCTCAGACTGGTTCTCCTTCTGTGCTTTCACCCTTTATTTGCACT  
TTCTTCCTTTTCTTCTCCTTTTCTTCTTTCGCGACTTGTTGATC**ATGCGCTTCG**  
**CCTTCTTTGCTATACTCTTTGCATCGGCTGCTCTCTGGGGATCTGCAGCTCCA**  
**ATTCCAGAGTACGCTCAGACACGATGCGGTTACATGGTTACTCAACTATATT**



CTTCTTTCCTCTTCAGCCCTAGCTTAACCCGCGCCAGCTTCATGCCATCAC  
CAAAGCCAGGCTGACCACCATCTGGCCAGGCAGAGCACCACTTCATCAT  
GCAGAGACACATTCTAATCATGCGGAGGCTGCACACCAGAGGTCTGTCCAC  
AAATTAGACTATGAAATATCGTGCACTGACAATGAGACAGTGGTAACCACC  
AAGCTGCTGCGACGCACGAGGGCCAATACCGTCACCATATGGCACAAGTGG  
ATTATCATACCGCTCAACACCAAAGCCACCAAGCTAAGGCCGACCAACTTG  
CTCAGCGTCGTAGTGTTCAAAGCATAGACGAGTTGGATTAGAGGATGTACT  
TTATTTTATAATCAATTCACGCGTGAAACGATTCTACTCAACTGCGAATGGT  
GCTGCACCGTGACTTGCCGCATTGGTGACCATGAACCATGATCCAGTAGAA  
AGGTTGTTGCAGTAATCGTTGTTAGATATCCACGTCAATGCGATTTCGCAACG  
AGATGTACACGACAAGGAGTCATTAGCATGGGCAC

***PIIN\_11103 :***

5'ACCCCTTGAATATTACGACCTAAAGTCCGAAATGATTCATAAATGGTCAG  
ACGCGTCTCTGCGCCTTTAAAAGAGGGCCTCCGTTGGGACCACAAAAACCTC  
AGACTGGTTCTCTTTTCTTTTCTTTTCTTCTTCTTTCAGCACTTTTCTTCGCA  
AAGTTCATTTTTCCCTTTTCAAATATTTCTACCTTTTTCACATCATGCGCTA  
CTCCTTCATCGCCGCTGTTCTCTCCACCGCTGCTCTCCTCGTCTCCGCCGCTC  
CTATCGAGCTGTAAGCACATAATCTCCTGCTATGACGTCAGCTTATAATATG  
TTATAGTGACGGGACCCACATGAACAGTCTCAAGGCTCGACACAATCCCC  
ACCGTCTCACACGCGGGCATTCTCCATGCCGAGGCCAAGCACGACGAACA  
TGCCGGTAAAGCCGAGTGGCATAGTAACAAGGCGGACCAGCACATCAGTGC  
CCAGAGGTCTGCTATGGACAGAGCTGCGACCCGCCCAATTCTGTAAACA  
CTACAACAGTTGATGCAAGAGGCCGTGCATCACGGTAGACAGGCCGACCA  
CCATATTGACCGAGCAGAGTGAATCCTTTATCAGTTGTTTCCACCCAAATTC  
TGACCATCCAAAGTCATCATTCGAGGAAGGCCGCTGAA3'

