

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物病理與微生物學研究所

碩士論文

Department of Plant Pathology and Microbiology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

以蛋白質學分析菸草中參與 Elicitin 作用之 SlSOBIR1

交互作用蛋白

Proteomics Analysis of SlSOBIR1-interacting Tobacco

Proteins Involved in Elicitin Signaling

黃俊慈

Chun-Tzu Huang

指導教授：劉瑞芬 博士

Advisor: Ruey-Fen Liou, Ph.D.

中華民國 103 年 6 月

June, 2014



誌謝



這本論文的開始、過程以及寫作，是我這一輩子非常珍貴的學習經驗！從一個對於科學懵懵懂懂的大學生，接觸到這個論文題目，慢慢地摸索研究的輪廓，進而逐漸構築實驗以及追尋答案與結果。兩年轉眼間就過去了，然而，接到題目時的興奮、構築實驗時的戰戰兢兢，以及追尋答案時的渴望，如今仍歷歷在目。而啟蒙我了解科學邏輯及研究精神的正是我的指導教授 劉瑞芬老師，在擔任系主任忙碌之時，老師每週仍然不辭辛勞地撥空與我們討論實驗以及討論期刊論文，直至今日，我仍不時在討論中感嘆於老師縝密的思考與精確的邏輯，並督促著自己努力學習。在實驗上，感謝可均學姊一路充滿愛心和耐心地從帶著我做實驗，到持續的與我討論實驗，這篇論文是承接學姊先前的發現，進而延伸的研究，因此可以說沒有可均，也許就不會有這篇論文了！

在蛋白體分析上，相當感謝張英峯老師及其實驗室熱心又專業的協助，不僅提供了實驗設計上的寶貴經驗，更在數據分析上提出了許多實用的建議，讓蛋白體部分的實驗分析能順利完成。另外，也要感謝 LAB403 的學長姐，遠在英國的志航學長，總是不厭其煩的回答我各種實驗上遇到的問題，並快速地提供我們 MPMI 相關的最新的研究發現及實驗技術；另外，特別感謝名威及漢麟學長總是適時地提供實驗上的指導及幫助；同時，感謝實驗室學姊芳瑜、怡萱經常在我實驗遇到問題時提供建議與幫忙。最後，感謝 LAB403 大家庭的每位成員，秉峰、裕雯、羽萱、柏諺、昱琄、芷菁、庭禕，大家都是在實驗甚或生活上不吝於分享和討論的夥伴。

論文的完稿則感謝口試委員 張英峯老師及 張孟基老師，兩位老師不僅在口試當下提供許多寶貴的建議，在論文修改上更是不遺餘力！最後，希望這篇論文未來能進一步發表，以感謝大家所投入的心血。

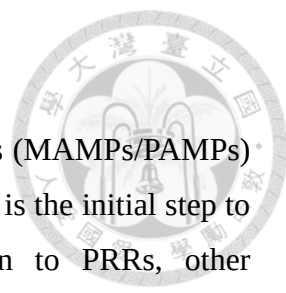
中文摘要



植物藉由細胞膜上之 pattern recognition receptor (PRRs)辨識病原保守性構造 pathogen/microbe-associated molecular patterns (PAMPs/MAMPs) 以啟動 PAMP-triggered immunity (PTI)。受到 PAMPs 活化之 PRRs 通常會與其他 leucine-rich repeat (LRR)-receptor-like kinases (RLKs) 交互作用，如 BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1)及 SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED (SOBIR1)，進而啟動 PTI 下游防禦反應。Elicitins 為疫病菌及腐黴菌特有的外泌性 elicitor 蛋白，能誘發部分雙子葉植物產生過敏性反應 (hypersensitive response, HR)，引起細胞壞疽性死亡。本實驗室近期發現番茄 *SlSOBIR1* 與 *SlSOBIR1-like* 參與 *Phytophthora parasitica* elicitin ParA1 引發壞疽的反應途徑，為能進一步瞭解 *SlSOBIR1* 在植物接收 ParA1 後相關的反應途徑，本研究以 *Nicotiana benthamiana* 為研究系統，透過共免疫沉澱與質譜儀分析，分析處理與未處理 ParA1 時之 *SlSOBIR1* 交互作用蛋白體，總共發現 157 個 *SlSOBIR1* 免疫共沉澱蛋白，其中 25 個蛋白只專一性的出現於 ParA1 處理組。基因註解分析發現三個 biological process Gene ontology (GO) terms 在 ParA1 處理時顯著提升，包含 cell communication, response to endogenous stimulus 以及 response to stress。為驗證這些基因是否參與 ParA1 誘導之過敏性反應，進一步以 TRV-mediated gene silencing 靜默其中 11 個基因，並於菸草葉片短暫表現 ParA1，結果發現降低 *NbArcA2* 及 *NbGBLP* (兩者皆為 guanosine nucleotide-binding proteins, G protein)，*NbPDR1* [ATP-binding cassette transporter (ABC) transporter]、*NbPR10* [pathogenesis-related (PR) protein]、*NbOligoA* (Oligopeptidase A)與 *NbrbohB* (NADPH oxidase)的表現量皆延遲及減少 ParA1 引發的細胞壞疽現象，其中尤以 *NbPDR1* 的作用效果最為顯著。

關鍵詞：PAMP-triggered immunity、receptor-like kinase、共免疫沉澱、交互作用蛋白體、elicitin、疫病菌

ABSTRACT



Recognition of microbe/pathogen-associated molecular patterns (MAMPs/PAMPs) by plasma membrane-localized pattern recognition receptors (PRRs) is the initial step to activate PAMP-triggered immunity (PTI) in plants. In addition to PRRs, other leucine-rich repeat receptor-like kinases are known to play important roles in PTI, including BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1), BAK1-INTERACTING RECEPTOR-LIKE KINASE1 (BIR1), and SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED (SOBIR1/EVR), which interact with the receptors to regulate downstream defense responses. Recently, tomato homologs of *SOBIR1* (known as *SISOBIR1* and *SISOBIR1-like*) are known to mediate plant basal defense against *Phytophthora parasitica*. Furthermore, they are involved in the signaling of ParA1, an elicitor of *P. parasitica*. In this study, coimmunoprecipitation (co-IP) and mass spectrometry were performed to identify SISOBIR1-interacting proteins to find out how SISOBIR1 mediates ParA1 signaling in *Nicotiana benthamiana*. A total of 157 SISOBIR1-interacting proteins were identified, of which 25 of them are associated with SISOBIR1 only in the presence of ParA1. GO term analysis indicated that three biological process terms were specifically enriched in response to ParA1 treatment, including cell communication, response to endogenous stimulus, and response to stress. To uncover their roles, we silenced 11 of the 25 genes by TRV-mediated gene silencing, and then expressed ParA1 by agroinfiltration. ParA1-induced necrosis is compromised upon silencing of *NbArcA2* and *NbGBLP* (guanosine nucleotide-binding proteins, G protein), *NbPDR1* [ATP-binding cassette transporter (ABC) transporter], *NbPR10* [pathogenesis-related (PR) protein], *NbOligoA* (Oligopeptidase A), and *NbrbohB* (NADPH oxidase), with silencing of *NbPDR1* showing the most prominent effect.

Key words: coimmunoprecipitation, elicitor, interactome, PAMP-triggered immunity, *Phytophthora parasitica*, receptor-like kinase

目錄



誌謝	i
中文摘要	ii
ABSTRACT	iii
目錄	iv
表目錄	vii
圖目錄	viii
縮寫對照表	ix
壹、前言	1
1. 植物防禦反應	1
1.1 植物先天免疫 (Plant innate immunity).....	1
1.2 PTI 防禦反應	1
1.3 PRRs (植物辨識 PAMPs/MAMPs 之受器).....	2
1.4 BAK1 在 PTI 扮演重要角色	3
1.5 SOBIR1 參與 LRR-RLP 所調控之 PTI 訊息傳導途徑.....	4
2. 植物病原卵菌	5
2.1 卵菌的特性及生活史	5
2.2 疫病菌 Phytophthora	6
3. Elicitin.....	8
3.1 Elicitin 之特性及分類	8
3.2 Elicitin 誘發之植物防禦反應及反應途徑	9
4. SOBIR1 參與 ParA1 誘導之訊息傳導途徑	9
5. 研究動機	11
貳、材料與方法	12
1. 植物材料與生長條件	12
2. 分析 SISOBIR1-GFP 與 SISOBIR-like-GFP 之分佈位置	12
2.1 農桿菌注射法 (Agroinfiltration).....	12
2.2 以雷射掃描式共軛焦顯微鏡 (Laser Scanning Confocal Microscope)	

觀察螢光蛋白分布位置.....	12
3. 純化 SISOBIR1-GFP 之交互作用蛋白	13
3.1 抽取植物全蛋白	13
3.2 免疫沉澱.....	13
3.3 西方轉漬法 (western blot)	14
4. 以質譜儀分析 SISOBIR1 共免疫沉澱蛋白	14
4.1 蛋白質萃取與免疫沉澱.....	14
4.2 質譜儀樣品前處理.....	14
4.3 質譜儀數據分析.....	16
5. 生物資訊學分析 SISOBIR1 共免疫沉澱蛋白	17
5.1 基因註解.....	17
6. SISOBIR1 共免疫沉澱蛋白功能性分析	17
6.1 TRV-mediated 基因靜默	17
7. RNA 表現量分析.....	18
7.1 抽取植物 RNA	18
7.2 製備 cDNA	19
7.3 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR).....	19
7.4 ParA1 處理.....	19
參、 結果.....	20
1. 共表現 ParA1 導致 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 向植物細胞質移動	20
2. 以免疫沉澱分離 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 在植物體內的交互作用蛋白	20
3. 利用 LC-MS/MS 辨識 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白	22
4. SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白結合 Gene ontology (GO)之功能性分析	23
5. ParA1 處理時 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白之 GO term enrichment 分析	25
6. 靜默 NbPDR1, NbPR10, NbOligoA, NbAraA2, NbGBLP, 或 NbrbohB 緩降 ParA1 誘導之細胞壞死	25

6.1	供試基因的挑選與命名	26
6.2	興趣基因靜默及 ParA1 誘導過敏性反應之功能性測試	27
肆、	討論	30
1.	以菸草分析 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 之免疫共沉澱蛋白	30
2.	以質譜儀辨識 SISOBIR1 之交互作用蛋白	31
3.	ParA1 處理時 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白的 GO terms 分布變化	34
3.1	ParA1 處理時 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白的 GO terms enrichment 分析	35
4.	供試基因在植物防禦反應中的生物意義	36
4.1	G proteins	36
4.2	Pleiotropic drug resistance protein	38
4.3	Reactive oxygen species (ROS) 生合成相關蛋白	39
4.4	防禦相關蛋白及其他	40
5.	結語	43
伍、	參考文獻	44
	附表	64
	附圖	77
	附錄	89

表目錄

表 一、	用於構築 TRV-mediated 基因靜默載體之核酸引子	64
表 二、	即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應所使用之專一性引子對	65
表 三、	SISOBIR1-免疫共沉澱蛋白一覽表 ^a	67
表 四、	後續探討參與 ParA1 誘導過敏性反應之菸草候選基因列表	76

圖目錄

圖 一、	ParA1 導致 SISOBIR1-GFP 向植物細胞質之囊狀構造移動	78
圖 二、	免疫雜合分析 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 之免疫共沉澱蛋白	79
圖 三、	以 Venn diagrams 呈現各處理情況下之 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白的數量	81
圖 四、	SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白之 GO term 分析	83
圖 五、	ParA1 處理時 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白之 GO term enrichment 分析	85
圖 六、	以 TRV-mediated gene silencing 技術靜默各供試基因之表現	86
圖 七、	靜默 NbPDR1, NbPR10, NbOligoA, NbGBLP 或 NbRbohB 之基因表現減少 ParA1 所誘導之細胞壞死情形	87

縮寫對照表



<i>HEAT SHOCK PROTEIN</i>	HSP
<i>TOO MANY MOUTHS</i>	TMM
<i>ARABIDOPSIS G PROTEIN β-SUBUNIT1</i>	AGB1
<i>ARABIDOPSIS G PROTEIN γ-SUBUNITs</i>	AGG1
arginine/aspartic acid	RD kinase
ATP-binding cassette transporter	ABC transporter
avirulence protein	Avr protein
<i>BAK1-INTERACTING RECEPTOR-LIKE KINASE1</i>	BIR1
bifluorescence complementation analysis	BiFC
<i>BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1</i>	BRI1
brassinosteroids	BR
<i>BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1</i>	BAK1
Ca ²⁺ -dependent transglutaminase	TGase
calreticulin	CRT
cellulose-binding domain	CBD
cellulose-binding elicitor lectin	CBEL
<i>CLAVATA2</i>	CLV2
Crinkler	CRN
damage-associated molecular pattern	DAMP
effector-triggered immunity	ETI
<i>EF-TU RECEPTOR</i>	EFR
<i>ELONGATION FACTOR-1α</i>	EF-1 α
endoplasmic reticulum	ER
ethylene-inducing xylanase	Eix
<i>FLAGELLIN-SENSING 2</i>	FLS2
<i>G PROTEIN α-SUBUNIT1</i>	GPA1
gene ontology	GO
glucose	Glc
guanine nucleotide binding protein	G protein
heat shock protein70-binding proteins	HSP70-BiP

hypersensitive response	HR
lectin-like receptor kinase	LRK
leucine-rich repeat	LRR
<i>LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN1</i>	<i>LRR1</i>
liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry	LC-MS/MS
mitogen-activated protein kinase	MAPK
mitogen-activated protein kinase kinase	MEK
Nep1-like protein	NLP
PAMP-triggered immunity	PTI
Pathogen related protein 10	PR10
pathogen/microbe-associated molecular pattern	PAMP/MAMP
pattern recognition receptor	PRR
<i>PEP1 RECEPTOR 1</i>	<i>PEPR1</i>
<i>PHENYLALANINE AMMONIA LYASE</i>	<i>PAL</i>
<i>PHYTOALEXIN DEFICIENT4</i>	<i>PAD4</i>
<i>PHYTOENE DESATURASE</i>	<i>PDS</i>
<i>PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE</i>	<i>PDR</i>
reactive oxygen species	ROS
receptor-like kinase	RLK
receptor-like protein	RLP
resistance protein	R protein
<i>RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASE-1</i>	<i>RBPG1</i>
salicylic acid	SA
salicylic acid-induced protein kinase	SIPK
SCLETOTINIA SCLEROTIORUM ELICITOR-1	SsE1
sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-PAGE
<i>SOMATIC EMBRYOGENESIS-RELATED KINASES 3</i>	<i>SERK3</i>
<i>SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED</i>	<i>SOBIR1/EVR</i>
trifluoroacetic acid	TFA
wound-induced protein kinase	WIPK
Yeast two hybrid	Y2H



壹、前言



1. 植物防禦反應

植物生長於充滿微生物的環境中，然而僅在少數情況下才會遭受感染。當微生物試圖入侵植物體時，植物可以透過物理與化學屏障，如蠟質 (wax)、角質層 (cuticle)、細胞壁，以及持續產生的抗微生物物質 (antimicrobial compounds) 等阻礙病原菌入侵。另一方面，植物亦能藉由辨識微生物之構造，引發免疫反應，以更有效的阻擋微生物入侵。

1.1 植物先天免疫 (Plant innate immunity)

在植物與微生物共演化的歷程中，植物發展出一系列防禦機制，稱為植物先天免疫 (plant innate immunity) (Jones and Dangl, 2006)，主要可區分為兩個層次，第一道防線由植物細胞表面的 pattern recognition receptors (PRRs) 專一性的辨識病原菌之保守性構造 pathogen/microbe-associated molecular patterns (PAMPs/MAMPs)，進而引發 PAMP-triggered immunity (PTI)，以抵擋微生物入侵植物。然而，部分病原菌透過分泌 effectors，抑制 PTI 相關訊息途徑或下游反應，使病原菌能成功侵染植物。因應病原菌分泌的 effectors，植物發展出第二道防禦機制，即演化出 resistance (R) proteins，其可辨識 effectors，以啟動 effector-triggered immunity (ETI)。ETI 常連帶引發過敏性反應 (hypersensitive response, HR)，造成病原侵入處之細胞快速死亡，形成壞疽型病斑 (necrosis)，以侷限病原菌之擴張 (Boller and He, 2009; Dodds and Rathjen, 2010)。目前普遍以 zig-zag-zig model 解釋植物與微生物之間共演化的攻防關係 (Jones and Dangl, 2006; Hein et al., 2009)。

1.2 PTI 防禦反應

相較於 PTI，ETI 引發的防禦反應較為強烈且持久，是早期抗病育種主要的研究方向 (Hulbert *et al.*, 2001)。然而，由於 ETI 的啟動具有高度專一性，應用於田間抗病育種時容易因病原菌突變而失效，因此近年來 PTI 的研究日趨重要 (Boller and He, 2009; Lacombe *et al.*, 2010; Monaghan and Zipfel, 2012)。植物辨識

PAMPs/MAMPs 後，快速啟動 PTI 相關防禦反應包括細胞離子流動 (ion fluxes)、活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)累積、胞吞現象 (endocytosis)、活化 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)、活化防禦基因，以及磷酸化相關蛋白等 (Greeff *et al.*, 2012)；此外阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中乙烯的生合成也是 PTI 啟動後重要的下游標的產物 (Zipfel, 2013)。而 PTI 後期之相關反應包括癒傷葡聚醣累積 (callose deposition) 及幼苗生長抑制，一般在接收 PAMPs 刺激數小時之後才能偵測到，且可持續數日之久 (Boller and Felix, 2009)。目前雖然已瞭解植物因應 PAMPs/MAMPs 刺激後細胞中發生的變化，然而，對於 PRRs 接收 PAMPs/MAMPs 後啟動下游反應所涉訊息傳導途徑所知有限，是近年來積極探討的方向。

1.3 PRRs (植物辨識 PAMPs/MAMPs 之受器)

植物藉由細胞膜上之 PRRs 辨識 PAMPs/MAMPs 以引發 PTI。一般依據細胞內 kinase domain 存在情形將 PRRs 分為兩大類：receptor-like kinases (RLKs) 及 receptor-like proteins (RLPs) (Afzal *et al.*, 2008)，其中 RLKs 為數龐大，在阿拉伯芥基因體約有 610 個保守性序列，依其胞外結構可區分為 44 個類群，其中 leucine-rich repeat (LRR)-RLKs 占約 40%，為數量最多的種類。根據序列特性將 LRR-RLKs 再區分為 13 個亞類群 (Shiu and Bleecker, 2001)。目前研究較深入的兩個阿拉伯芥 PRRs，FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) 及 EF-TU RECEPTOR (EFR)，皆屬於 LRR-RLKs。FLS2 為第一個發現的 PRR，其胞外構造具有 28 個 LRRs，負責辨識細菌鞭毛之保守性胺基酸序列 flg22，屬於亞類群 LRR XII (Gómez-Gómez and Boller, 2000)。EFR 負責辨識細菌 EF-TU 之保守性胺基酸序列 elf18/26，亦屬於 LRR XII，惟其胞外構造僅具有 21 個 LRRs (Zipfel *et al.*, 2006)。另外，FLS2 以及 EFR 之 C 端皆含 serine/threonine kinase domain，且皆屬於非典型 RD kinase (non-RD kinase) (Dardick and Ronald, 2006)。雖然 non-RD kinase 在植物或動物基因體所佔的比例極低，然而，目前已知屬於 RLK 類之 PRRs 多屬於 non-RD kinases，說明 non-RD kinases 在辨識 MAMPs/PAMPs 上可能具有相當的重要性 (Boller and Felix, 2009)。

RLPs 為細胞膜上另一類主要的 PRRs，其和 RLKs 同樣具有胞外 LRR domain 以及單一個 transmembrane domain，唯一的不同為 RLPs 胞內構造並不具有 kinase domain 或任何 motif。番茄 (*Solanum lycopersicum*) Cf-9 為植物最早被發現的



LRR-RLP，其辨識番茄真菌病原 *Cladosporium fulvum* 分泌之 avirulence (Avr) proteins Avr9 後啟動過敏性反應，引發細胞壞疽 (Jones *et al.*, 1994; Rivas and Thomas, 2005)。依據 Cf-9 之胺基酸序列特性，將其由 N 端至 C 端區分為 A 至 G domains，包括：signal peptide 之預測區域 (domain A)、成熟蛋白之 N 端區域 (domain B)、具有 27 個 LRRs motifs 之區域 (domain C)、區隔 domain C 及 domain E 之小片段胺基酸序列 (domain D)、小片段偏酸性之胺基酸序列 (domain E)、穿膜區域 (domain F)，以及胞內一小段胺基酸序列 (domain H)。目前已知的多數 RLPs 皆與 Cf-9 之蛋白結構相近，稱為 ‘Cf-like RLP’ (Fritz-Laylin *et al.*, 2005)，包含番茄 Ve proteins 及 ETHYLENE-INDUCING XYLANASE RECEPTOR 2 (Eix2)。RLPs 除了辨識病原刺激外，亦參與植物生長與發育相關的生理功能 (Yang and Sack, 1995; Nadeau, 2002)，由於其細胞中不具有功能性 domain 及 motif，一般被認為必需與其他蛋白產生交互作用，才具有啟動下游反應的能力 (Liebrand *et al.*, 2014)。

1.4 BAK1 在 PTI 扮演重要角色

BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1) 為接收植物固醇類荷爾蒙 brassinosteroids (BR) 之 receptor-like kinase，在植物的生長與發育扮演重要角色，是最早被發現的植物 RLK (Wang *et al.*, 2001)。BRI1 接收 BR 刺激後，快速地與 BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1) 形成 heterodimer，進而啟動下游相關反應 (Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002; Russinova *et al.*, 2004)。在序列特性上，BAK1 屬於 LRR II somatic embryogenesis-related kinases 3 (SERK3) 次亞類群 (Hecht *et al.*, 2001)。

BAK1 除了在植物生理扮演重要角色，亦在植物 PTI 具有重要功能。FLS2 與 EFR 分別辨識 flg22 及 elf18/26 後，皆快速地與 BAK1 形成 heterodimer (Heese *et al.*, 2007; Chinchilla *et al.*, 2007; Roux *et al.*, 2011)；此外，BAK1 亦能與其他 PRRs 交互作用，影響其下游反應的發生，包含：辨識在阿拉伯芥發現之 damage-associated molecular patterns (DAMPs) Pep1 及 Pep2 之 PEP1 receptor 1 (PEPR1) 與 PEPR2 (Postel *et al.*, 2010)；以及負責辨識在真菌 *Trichoderma viride* 所發現之 PAMP ethylene-inducing xylanase (Eix) 之 Eix2 (Bar *et al.*, 2010)。

1.5 SOBIR1 參與 LRR-RLP 所調控之 PTI 訊息傳導途徑

在阿拉伯芥的研究顯示，突變 *BAK1-INTERACTING RECEPTOR-LIKE KINASE1 (BIR1)* 使植株的防禦反應提高，呈現防禦性細胞死亡的表徵，因此為防禦性細胞死亡途徑之負調控基因。透過篩選抑制 *BIR1* 突變株性狀的基因，發現突變 *PHYTOALEXIN DEFICIENT4 (PAD4)*，屬於 Toll-Interleukin-1 Receptor-like-Nucleotide-Binding-Leu-Rich Repeat domain class resistance protein) 能部分回復 *BIR1* 突變株的性狀 (Gao *et al.*, 2009)；而突變 *SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED (SOBIR1/EVR)*；一種 LRR-RLK) 能抑制 *bir1-1* 突變株所呈現之過度細胞死亡的性狀，因此 SOBIR1 為 BIR 相關細胞死亡途徑之正調控基因 (Gao *et al.*, 2009)；此外，突變 SOBIR1 亦導致植物對 *Pseudomonas syringae* 之抗病能力下降，說明 SOBIR1 參與植物對抗細菌病害之防禦機制。

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 具有二個阿拉伯芥 SOBIR1 之同源性基因，分別為 *SlSOBIR1* (Soly006g071810) 及 *SlSOBIR1-like* (Soly003g111800) (Liebrand *et al.*, 2013)，兩者胺基酸序列相同度高達 72.9%，皆能與數種 LRR-RLPs 產生交互作用，例如 Cf, Eix, Ve proteins 等。Cf proteins 負責辨識番茄真菌病原 *C. fulvum* 分泌之 avirulence (Avr) proteins 以啟動下游防禦反應，造成細胞死亡 (Jones *et al.*, 1994; Rivas and Thomas, 2005)；Ve proteins 包含 Ve1 及 Ve2 蛋白，兩者相似度高達 84%，然而僅 Ve1 參與番茄抗真菌病原 *Verticillium dahliae* 的抗病機制 (Fradin *et al.*, 2014)，近年發現 Ve1 透過辨識 Ave1 啟動下游過敏性反應 (Jonge *et al.*, 2012)。靜默菸草 SOBIR1 同源性基因的表現量可顯著緩解 Cf-2/Avr2, Cf-4/Avr4 及 Ve1/Ave1 所引發的細胞死亡現象，而降低番茄 *SlSOBIR1* 及 *SlSOBIR1-like* 的表現量導致番茄對 *C. fulvum* 和 *V. dahliae* 的抗性下降，其中以 *SlSOBIR1* 基因靜默造成的影響較大，顯示 *SlSOBIR1* 在防禦反應的功能較為重要 (Liebrand *et al.*, 2013)。除了抗病相關 LRR-RLPs 外，*SlSOBIR1* 及 *SlSOBIR1-like* 也與調控生長發育之 LRR-RLPs 如番茄之 *CLAVATA2 (SlCLV2)* 及 *TOO MANY MOUTHS (SlTMM)* 有交互作用，但和 *FLS2*、*BAK1* 以及 *CLV1* 等 LRR-RLKs 卻沒有交互作用 (Liebrand *et al.*, 2013)。此外，阿拉伯芥 SOBIR1 並不參與 *FLS2* 辨識 flg22 啟動 PTI 的過程 (Zhang *et al.*, 2013b)。

近年兩篇獨立研究分別顯示，突變 *AtRLP30* 導致植物喪失辨識真菌病原 *Sclerotinia sclerotiorum* 之 PAMP SCLETOTINIA SCLEROTIORUM ELICITOR-1 (SsE1) 的能力，進一步以 *SOBIR1* 突變株測試，發現突變 *SOBIR1* 降低 *AtRLP30* 所調控的防禦機制，顯示 *SOBIR1* 參與 *AtRLP30* 辨識 SsE1 啟動 PTI 的反應途徑 (Zhang *et al.*, 2013b)；此外，阿拉伯芥之 RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASE-1 (RBPG1) 為辨識真菌 PAMPs endopolygalacturonases 之 PRR，亦為一 LRR-RLP，突變 *SOBIR1* 後降低 RBPG1 辨識 endopolygalacturonases 所引發的細胞死亡，說明 *SOBIR1* 亦參與 RBPG1 所調控的植物防禦機制 (Zhang *et al.*, 2014)。有趣的是，*SOBIR1* 與 RBPG1 在蛋白層次亦具有交互作用關係。目前關於 *SOBIR1* 的研究顯示，其廣泛地與 LRR-RLPs 交互作用，且在植物對抗細菌及真菌病原的防禦反應扮演重要角色 (Liebrand *et al.*, 2014)。

2. 植物病原卵菌

卵菌的型態特徵及營生方式皆類似真菌，因此早期被歸類於真菌界 (Fungi)，近年來利用核酸序列進行類緣分析，發現卵菌與矽藻及褐藻等之親緣關係較為相近，故目前被分類在雜色藻界 (Chromista) (Baldauf *et al.*, 2000)。

2.1 卵菌的特性及生活史

卵菌的生活型態豐富，包含水黴菌及寄生於其他生物如：植物、藻類、昆蟲、魚類、哺乳類及各種微生物之病原菌 (Kamoun, 2003, 2006)。造成重大農業損失的卵菌類病原包含疫病菌 *Phytophthora*、腐黴菌 *Phythium* 及露病菌 *Peronospora*, *Plasmopora* 及 *Bremia* 等，其中又以 80 餘種疫病菌及 100 餘種腐黴菌造成的危害最為嚴重 (Göker *et al.*, 2007)。

卵菌類植物病原生長及侵染寄主的過程主要包含幾個重要的階段，其在陰濕的環境下於寄主表面生長出孢囊梗與孢囊，孢囊遇水時即行間接發芽，而孢囊之細胞質分化後生成游走子。孢囊及游走子藉由水分傳播並固著於新寄主，等待環境適當時便萌發形成菌絲與壓器以侵入新寄主，隨後產生初級及次級菌絲並形成吸器。當寄主死亡或環境不適合生長時，卵菌類病原可透過形成厚膜孢子或經由

有性生殖產生卵孢子以進行休眠，直到環境適合生長時再開始下一次的生活史 (Lamour and Kamoun, 2009)。卵菌之有性世代主要透過藏卵器及藏精器行有性生殖並產生卵孢子，卵孢子的產生不但增加疫病菌之遺傳變異性，其厚壁構造有助於抵抗逆境，為疫病菌渡過乾燥等不良環境的重要方式之一 (Judelson, 2009)。

2.2 疫病菌 *Phytophthora*

疫病菌為卵菌中相當重要的植物病原菌，其營生方式主要屬於半活體寄生 (hemibiotrophic)，在感染早期屬於活體寄生 (biotroph)，由植物組織獲取養分；而感染後期轉換成腐生型 (necrotroph)，造成植物細胞死亡，以利疫病菌在植物體內的擴散與感染 (Münch *et al.*, 2008; Lee and Rose, 2010)。目前已發現上百種疫病菌，超過六成為植物病原 (Thines and Kamoun, 2010; Kroon *et al.*, 2012)，不同物種的疫病菌具有不同的寄主範圍，主要區分為兩大類，第一大類具有高度的寄主專一性，如晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 主要感染馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 及少數的茄科作物 (Nowicki *et al.*, 2011)、大豆疫病菌 *Phytophthora sojae* 主要感染大豆 (*Glycine max*) 及少數的羽扇豆 (*Lupinus species*) (Tyler, 2007)、及草莓疫病菌 *Phytophthora fragariae* 主要感染草莓 (*Fragaria ananassa*) 及覆盆子 (*Rubus species*) (Scheewe, 1994)；第二類疫病菌的寄主範圍則較為廣泛，例如 *Phytophthora capsici* (Lamour *et al.*, 2012) 與 *Phytophthora parasitica* (Kamoun *et al.*, 1993)，後者可感染的植物寄主高達數百種，包含於茄科作物、豆科、芸香科、蘭科及十字花科等，為世界上相當重要的植物病原菌 (Erwin and Ribeiro, 1996)。

2.2.1 疫病菌之 PAMPs

疫病菌具有許多外泌蛋白，有些外泌蛋白能改變植物細胞結構及功能，以協助疫病菌侵染植物，有些則會引發植物防禦反應 (Gijzen and Nürnberger, 2006; Hein *et al.*, 2009)。目前疫病菌已知的外泌性蛋白主要分為兩大類，包含 cytoplasmic effectors 及 apoplastic effectors。Cytoplasmic effectors 具有特殊的胺基酸序列，可於疫病菌外泌後進入植物細胞內，依胺基酸序列特性將其區分為兩個大類，分別為 RXLR effectors 及 Crinklers (Stassen and Van den Ackerveken, 2011; Kamoun, 2006)。

RXLR-effectors 之蛋白 N 端帶有 signal peptide 及調控 effector 進入宿主之 RXLR-motif (R: Arginine, X 代表任何胺基酸, L: Leucine, Arginine), 此外, 通常還帶有 dEER-motif (d: glutamic acid, E: aspartic acid, R: arginine), 然而, 目前關於 RXLR-motif 將 effector 送入植物細胞之機制尚未定論, 仍待進一步研究證實 (Whisson *et al.*, 2007; Dou *et al.*, 2008; Kale *et al.*, 2010; Tyler *et al.*, 2013); RXLR effectors 之蛋白 C 端為歧異度較高的 effector domain (Haas *et al.*, 2009)。另一大類之 cytoplasmic effectors 為 Crinklers (CRNs), 其蛋白 N 端為 signal peptide, 通常具有與 CRNs 進入植物細胞相關之 LXLFLAK-motif。LXLFLAK-motif 之後, 為 DWL-domain 及 HVLVXXP-motif (Haas *et al.*, 2009); CRNs 的蛋白 C 端則與 RXLR-effectors 相同, 為歧異度較高的 effector domain (Schornack *et al.*, 2010)。另一類外泌性蛋白為 apoplastic effectors, 其由疫病菌外泌後不進入植物細胞內, 主要位於植物之細胞間隙, 如: GP42, cellulose-binding elicitor lectin (CBEL), Nep1-like proteins (NLPs) 及 elicitors 等, 以下先分別介紹 GP42, CBEL 及 NLPs, 而 elicitors 則在下一節詳細介紹。

GP42 為 Ca^{2+} -dependent transglutaminase (TGase), 是一廣泛存在於 *P. sojae* 細胞壁之醣蛋白, TGase 可引發植物防禦反應, 研究顯示僅需要 GP42 之 13 個保守性胺基酸序列 (Pep13) 即能啟動 PTI (Nürnberger *et al.*, 1994); 除了引發 PTI, Pep13 同時也是構成 TGase 活性區的重要胺基酸序列 (Nürnberger *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002)。由於 Pep13 在疫病菌中具有保守性, 且為植物專一性辨識的區位, 因此為目前疫病菌中最具代表性的 PAMPs (Garcia-Brugger *et al.*, 2006)。

CBEL 最早在 *P. parasitica* var. *nicotianae* 被發現, 其分子量約為 34 kDa, 在疫病菌中具有高度保守性 (Mateos *et al.*, 1997; Gaulin *et al.*, 2002), CBEL 能與植物細胞表面之 cellulosic substrates 結合, 為一細胞壁結合蛋白 (Gaulin *et al.*, 2006)。此外, 其能誘發菸草產生過敏性反應造成細胞死亡, 並提升下游防禦基因之表現量 (Mateos *et al.*, 1997)。當突變 CBEL 蛋白之兩個保守性的 cellulose-binding domain (CBDs), 則無法引發植物防禦反應, 並造成 CBEL 喪失與植物細胞壁結合的能力 (Gaulin *et al.*, 2006), 顯示 CBEL 可能帶有引發植物防禦反應的 PAMPs。

NLPs 最早分離於真菌病原 *Fusarium oxysporum* 之培養液 (Bailey, 1995), 其廣泛地存在於植物病原細菌、真菌及卵菌, 為一大約 25 kDa 之細胞壁相關蛋白

(Gijzen and Nürnberger, 2006)。疫病菌 *P. parasitica*, *P. sojae*, 及 *P. infestans* 皆具有 NLPs (Fellbrich *et al.*, 2002; Qutob *et al.*, 2006)。研究顯示 *P. sojae* 及 *P. infestans* 侵染植物後期大量表現 NLPs 基因，顯示 NLPs 可能與疫病菌由 biotrophs 轉換至 necrotrophs 的過程有關 (Qutob *et al.*, 2002)。相關研究顯示，降低 Salicylic acid-induced protein kinase (SIPK) 及 NbWRKY2 之表現量，減少 NLPs 誘發之細胞死亡，顯示 NLPs 誘發之細胞死亡與 MAPK 訊息傳導途徑相關 (Zhang *et al.*, 2012)。然而，NLPs 在病原菌致病力，及其誘發植物啟動防禦反應之保守性區域仍待進一步探討 (Hein *et al.*, 2009)。

3. Elicitin

Elicitins 為疫病菌 (*Phytophthora* spp.) 及腐黴菌 (*Pythium* spp.) 所分泌的蛋白，能誘發部分雙子葉植物，包含 *Nicotiana* sp. 產生過敏性反應，被視為誘導植物抗性反應的 elicitors (Ricci *et al.*, 1989; Kamoun *et al.*, 1993, 1997)。

3.1 Elicitin 之特性及分類

Elicitin 為分子量約為 10-kDa 之外泌蛋白，具有三對影響蛋白構形之雙硫鍵。由於疫病菌及腐黴菌無法自行合成 sterols，而 elicitins 被發現具有結合 sterols 的能力，因此被認為可能是卵菌自環境週遭獲取 sterols 的重要蛋白 (Mikes *et al.*, 1997, 1998)。

Elicitin 在跨物種間具有高度保守性，依據蛋白結構及類緣分析將不同疫病菌與腐黴菌之 elicitin 分為三群 (Ponchet *et al.*, 1999)，分別以羅馬數字代表如下：第 I 群，一般具有 98 個胺基酸序列，大多數已知的 elicitin 皆屬此類群，依據蛋白特性可再分為 Ia 及 Ib 兩型；*P. capsici* 之 capsicein, *P. infestans* 之 INF1 及 *P. parasitica* 之 ParA1 皆屬於 Ia，其 pI 值一般低於 5；*Phytophthora cryptogea* 之 cryptogein 屬於 Ib，其 pI 值高於 7.5，一般而言以 β 型引發之過敏性反應較強。第 II 群之 elicitins 比第 I 群在 C 端多出 5 個胺基酸，主要成員為 *P. cryptogea* 及 *Phytophthora cinnamomi* 之 hyperacidic elicitins；第 III 群為 elicitin-like proteins，包括 *P. infestans* 之外泌蛋白 INF2A 及 INF2B (Kamoun *et al.*, 1997; Liou, 2001)。

3.2 Elicitin 誘發之植物防禦反應及反應途徑

Cryptogein 及 INF1 為研究較為深入的 elicitors。在 *N. tabacum* 細胞處理 cryptogein 的研究顯示，當添加 Ca^{2+} 螯合劑或 Serine/Threonine protein kinase 抑制劑時，降低 ROS 的累積量，顯示細胞之 Ca^{2+} 及蛋白磷酸化狀態之改變皆為活化 respiratory burst oxidase NtRbohD (NADPH oxidase, ROS 重要的生合成蛋白) 以啟動 ROS 生合成途徑之重要上游反應 (Simon-Plas *et al.*, 2002)。蛋白磷酸化狀態之改變除了影響 ROS 的生合成外，亦影響其他 PTI 下游反應，包含：細胞 Ca^{2+} 流動、活化 MAPK cascades (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998)、調控一氧化氮 (nitric oxide) 之生合成 (Lamotte *et al.*, 2006)、陰離子濃度降低造成之細胞膜去極化 (Pugin *et al.*, 1997; Wendehenne *et al.*, 2001)、glucose (Glc) 運輸受限 (Bourque *et al.*, 2002)，及抑制 H^+ -ATPase 活性 (Garcia-Brugger *et al.*, 2006) 等相關反應。然而，目前尚不清楚接收 cryptogein 之受器，因此植物辨識 cryptogein 以啟動下游相關反應之分子機制仍待進一步探討。

另一方面，INF1 的研究顯示，基因靜默 *Nicotiana benthamiana* 之 NbRbohA 及 NbRbohB (Yoshioka *et al.*, 2003), heat shock proteins Hsp90 及 Hsp70 (Kanzaki *et al.*, 2003), ubiquitin ligase-associated protein NbSGT (Peart *et al.*, 2002), NbBAK1 (Chaparro-Garcia *et al.*, 2011), 以及 lectin-like receptor kinase NbLRK1 (Kanzaki *et al.*, 2008), 皆會影響 INF1 引發之過敏性反應。另外，以 INF1 處理 *Nicotiana tabacum* 細胞，能誘導防禦相關基因 phenylalanine ammonia lyase (NtPAL) 以及 pleiotropic drug resistance (PDR)-type ATP-binding cassette (ABC) transporter homolog (NtPDR1) 表現量上升 (Sasabe *et al.*, 2000, 2002)。另一方面，以 protein phosphatase inhibitor 處理，則使 NtPAL 及 NtPDR1 兩基因的表現量上升，顯示 NtPAL 及 NtPDR1 的基因表現為蛋白磷酸化之下游反應，然而，兩基因在 elicitin 誘導之植物防禦反應扮演的角色仍待進一步研究。

4. SOBIR1 參與 ParA1 誘導之訊息傳導途徑

本實驗室先前以 TRV-mediated 基因靜默技術調降番茄 *SISOBIR1* 與 *SISOBIR1-like* 基因表現後發現番茄對 *P. parasitica* 之抗性下降，進一步於菸草 *N.*



benthamiana 葉片表現 SISOBIR1 及 SISOBIR1-like 之重組螢光蛋白，並以 *P. parasitica* 游走孢子接種，發現累積於細胞膜上之 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 由細胞膜往細胞內移動。為瞭解 *P. parasitica* 造成 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 移動的原因，進一步以 *P. parasitica* 之 PAMPs 處理，發現 ParA1 (其為 *P. parasitica* 之 elicitor) 能專一性誘導 SISOBIR1 及 SISOBIR1-like 移動。另外，降低 *N. benthamiana* 之 SOBIR1 同源性基因 *NbSOBIR1* 及 *NbSOBIR1-like* 之表現量後，顯著降低 ParA1 引發的下游防禦反應，包含：降低 ROS 累積量、減少癒傷葡聚糖累積量、降低下游 PTI 基因表現量，以及降低過敏性反應造成的細胞壞疽現象。另一方面，短暫表現 SISOBIR1、SISOBIR1-like 以及 *NbSOBIR1* 於基因靜默葉片，皆能互補 ParA1 引發的下游防禦反應，說明番茄與菸草之 SOBIR1 homologs 在 ParA1 誘導之訊息傳導途徑中，具有跨物種之保守性功能 (Peng *et al.*, unpublished)。

5. 研究動機

藉由遺傳學相關研究方法，目前已瞭解許多參與 PRRs 誘導之下游反應途徑之重要調控基因，包含 *BAK1*, *BIR1*, *SOBIR1* 等，這些調控基因除了影響 RLKs 啟動之下游反應外，蛋白層次的研究證實其亦與 RLKs 交互作用。近年來，許多研究相繼利用免疫沉澱搭配液相層析串聯式質譜儀分析 RLKs 之交互作用蛋白，並探討其在植物生理或防禦反應的功能，其中以探討 BRI1 相關訊息傳導途徑的研究較為深入 (Tang *et al.*, 2010)。而在植物防禦上，以免疫沉澱搭配質譜儀分析 EFR 接收 elf18/26 後蛋白複合體組成之變化，發現在 elf18/26 處理時，BAK1 (SERK3) 及 BKK1 (SERK4) 與 EFR 產生交互作用 (Roux *et al.*, 2011)。因此，以質譜儀分析 PRRs 及其他 RLKs 之交互作用蛋白，是瞭解植物中 RLKs 訊息傳導途徑的有效方式之一。本研究希望藉由免疫沉澱搭配質譜儀分析探討 *P. parasitica* elicitor ParA1 處理 *N. benthamiana* 時 *SOBIR1* 之交互作用蛋白的特性與功能，以進一步瞭解 *SOBIR1* 參與 ParA1 誘導之過敏性反應所涉及的分子機制。

貳、材料與方法



1. 植物材料與生長條件

菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 栽種方式為將種子播種於濕潤泥炭土，兩週後種子發芽並長出幼苗，即將幼苗移植至栽培介質(泥炭土：根基旺=1: 1)，並栽種於 25°C、光週期為 12 小時黑暗/12 小時光照的生長環境中。

2. 分析 SISOBIR1-GFP 與 SISOBIR-like-GFP 之分佈位置

2.1 農桿菌注射法 (Agroinfiltration)

將攜有 pK7FWG2::SISOBIR1-GFP (Peng *et al.*, unpublished) 與 pK7FWG2::SISOBIR1-like-GFP (Peng *et al.*, unpublished) 表現載體的農桿菌 (C58C1) 培養於含有抗生素 100 ppm spectinomycin 和 12.5 ppm tetracycline 的 LA 平板培養基(1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar)，待菌落長出後，挑選單菌落培養於含有抗生素 100 ppm spectinomycin 之 LB (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)，於 28°C 培養 16 小時後，將培養菌液與 MMA [10 mM MES, pH 5.5 (90 mM sodium phosphate buffer, 7 mM ammonium sulfate, 1.5 mM sodium citrate, 1 mM MgSO₄, 0.2% glucose, 0.1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, and 200 mM acetosyringone)] 等體積混合，以 6000 rpm 離心 5 分鐘以洗去 LB 中之抗生素與雜質，接著以 1 mL MMA 懸浮菌塊，並調整至適當濃度(攜帶 pK7FWG2::SISOBIR1-GFP, pBI121-ParA1 及 pBI121 者為 OD₆₀₀=0.3; 攜帶 pK7FWG2::SISOBIR1-like-GFP 者為 OD₆₀₀=0.5)後，注射於 4 週大的菸草葉片。

2.2 以雷射掃描式共軛焦顯微鏡 (Laser Scanning Confocal Microscope) 觀察螢光蛋白分佈位置

以農桿菌注射法進行蛋白短暫表現後，於不同時間點切取菸草葉片，利用共軛焦螢光顯微鏡 (TCS SP5II, Leica, 國立臺灣大學農業資源共同儀器中心)，透過

40x/1.25 與 63x/1.40 油鏡 (HCX PL APO lambda blue)以激發光波長 488 nm 及發散光波長 505-530 nm，觀察螢光蛋白在菸草表皮細胞的分布位置。



3. 純化 SISOBIR1-GFP 之交互作用蛋白

3.1 抽取植物全蛋白

以農桿菌注射法於 4 週大的菸草葉片短暫表現蛋白後 22 小時，收取植物葉片，以液態氮急速冷凍並保存於 -80°C 待用。抽取植物全蛋白時，於葉片解凍前依比例(2 mL/g 葉片重量)加入 lysis buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 10% glycerol, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, freshly added 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), 1% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich), 10 mM DTT, 1% polyvinylpyrrolidone, and 1 mM PMSF] (Roux *et al.*, 2011)；為了增加膜蛋白之溶解度，另於 4°C 以超音波震盪器(Branson ultrasonic, PC-600, USA)震盪蛋白粗抽物。接著，將葉片以 13000 rpm (4°C)離心 20 分鐘，上清液即為粗抽之全蛋白，並進一步利用 Bradford 法進行蛋白定量，其中使用蛋白測定劑為 Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，接著取等量的粗抽蛋白進行免疫沉澱或蛋白電泳分析。

3.2 免疫沉澱

粗抽菸草葉片全蛋白以濾膜 (0.45 μm , Millipore Express PLUS Membrane Filters, Millipore, Billerica, MA, USA)過濾後，取總蛋白含量 10 mg 之濾液，加入兩倍體積之 dilution buffer [50 mM Tris, pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, freshly added 1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich), and 1 mM PMSF] 進行稀釋以降低 lysis buffer 中的介面活性劑濃度，再加入 15 μL GFP_TrapA 磁珠 (50% slurry, ChromoTek, Marinsried, Germany)於 4°C 免疫沉澱過夜後，於 4°C 以 2700 rpm 離心 2 分鐘收取磁珠之後以 1 mL extraction buffer 懸浮磁珠及離心，如此重複 5 次，以洗去磁珠上非專一性結合的蛋白。接著加入 30 μL 2X sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sample loading buffer (1X sample loading buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1% 14.7 M β -mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, 0.02% bromophenol blue)於 70°C 加熱 15 分鐘，

以 2700 rpm 離心，上清液即為免疫沉澱產物。



3.3 西方轉漬法 (western blot)

12.5 % SDS-PAGE 膠體在 Tris-glycine buffer (25 mM Tris, 250 mM glycine pH 8.3, 0.1% (w/v) SDS) 中以電壓 25 V 跑約 50 min，接著利用半乾式蛋白轉漬槽 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 將蛋白自 SDS-PAGE 轉漬到 PVDF 膜後，於室溫下置於阻斷液 [5% skim milk in PBS buffer (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH7.4)] 40 分鐘，以防止非專一性結合，接著利用稀釋 2500 倍之 anti-GFP (anti-rabbit-eGFP diluted with 1% milk in PBS) 作用 1 小時，利用 PBST (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 漂洗三次，每次 10 分鐘。接著加入稀釋 20000 倍之 rabbit anti-horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody 二次抗體，作用 1 小時，再以 PBST 漂洗三次，每次 10 分鐘，最後加入 HRP 之作用基質 ECL (Millipore) 作用一分鐘後，以 Fiji Super RX-N 底片偵測訊號。

4. 以質譜儀分析 SISOBIR1 共免疫沉澱蛋白

4.1 蛋白質萃取與免疫沉澱

依據材料與方法 3.1.-3.3. 所述方式製備質譜儀分析所需樣品：在共免疫沉澱時，取 15 mL 蛋白萃取濾液以 dilution buffer [50 mM Tris, pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, freshly added 1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich), and 1 mM PMSF] 進行稀釋，再加入 60 μ L GFP_TrapA 磁珠於 4°C 進行免疫沉澱。翌日，以 1 mL extraction buffer 清洗五次後，移除上清液，以利後續進行質譜儀樣品前處理。

4.2 質譜儀樣品前處理

4.2.1 On-bead trypsin digestion

免疫沉澱後收集之磁珠以 1 mL PBS (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3



mM KCl, 135 mM NaCl, pH7.4)清洗兩次，徹底洗去殘留之界面活性劑後，將磁珠等分成三份，並在各樣品中加入 50 μ L denaturation buffer (2M urea, 100 mM Tris, 10 mM DTT, pH7.5)於室溫震盪 20 分鐘，再加入 iodoacetamide 至終濃度為 50 mM，並於黑暗中震盪 10 分鐘。接著，加入 1.2 μ g trypsin (sequencing grade modified trypsin, Promega, Madison, WI, USA)在室溫持續震盪以酵解蛋白。兩小時後，以 4000 rpm 離心 4 分鐘，上清液即為已分解為多肽鏈的共免疫沉澱物。之後，為了避免磁珠上殘留共免疫沉澱蛋白，再次加入 50 μ L denaturation buffer，於室溫下震盪 5 分鐘，並以 4000 rpm 離心 4 分鐘後，再次收集上清液，並與第一次的上清液合併。接著，在上清液中加入 0.4 μ g trypsin，並於 37°C 作用以酵解未完全切割之多肽鏈片段。翌日，加入 10% trifluoroacetic acid (TFA)至終濃度為 0.5 % TFA 以中止反應。最後，以真空離心機 (Heto Maxi Dry Lyo, Allerod, Denmark)抽乾樣品，並儲存於-80°C 以便後續製備質譜儀樣品。

4.2.2 樣品去鹽前處理

以 60 μ L 之 0.5% TFA 回溶真空乾燥的樣品，接著以 C18 Stage Tips (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)去鹽，其中 wash buffer 為 [5% acetonitrile (ACN), 0.1% TFA]，最後多肽鏈以 20 μ L elution buffer (80% ACN, 0.1% TFA)沖提，多肽鏈沖提液再以 miVac DUO concentrator (Genevac, Ipswich, UK)真空乾燥，最後將多肽鏈回溶於 0.5% TFA 中，以進行後續質譜儀分析。

4.2.3 液相層析串聯式質譜分析

Nano liquid chromatography (LC)-mass spectrometry (MS)/ mass spectrometry (MS)分析委託輔仁大學宗倬章先生紀念質譜儀實驗室進行，所使用之系統為 LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific)，並搭載 Dionex Ultimate 3000 RSLC system (Thermo Scientific) 極致效能液相層析系統與 nano-ESI 電噴灑離子源。分離用毛細管柱為裝填 Reprosil C18 materials (3 μ m, Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany)之 spray tip (150 mm length $\times$ 100 μ m I.D., 5 μ m opening on the tip)。Nano-LC 之樣品裝填及沖提條件設定流速為 500 nL/min，多肽鏈以 95% buffer A (0.5% acetic acid)裝填入管柱中，再以三階段不同濃度之 buffer B (80% acetonitrile,

0.5% acetic acid)沖提管柱，分別為：5-10% B in 5 min, 10-40% B in 60 min, 40-99% B in 5 min，電噴灑離子源的 spray voltage 設定為 2.4 kV。質譜儀部分，以 data-dependent acquisition mode 的方式做串聯式質譜分析 (tandem MS)。首先母離子 (precursor ion) 以 Orbitrap 質量分析器 (FWHM 60,000 resolution at m/z 400) 作掃描分析，掃描範圍為 m/z 300-1600。接著，將母離子掃描 (precursor ion scan) 中挑選訊號強度排名前 10 之離子進一步以 collision-induced dissociation (CID) 的方式擊碎，碎片離子再以 Linear ion-trap 質量分析器分析而得到其碎片離子質譜圖。

4.3 質譜儀數據分析

4.3.1 資料庫比對

利用 Discoverer (Thermo Scientific) 將 MS 分析所得的原始數據轉換為 Mascot Generic Format，再利用 Mascot (Matrix Science, Version 2.3.02) 以 Sol genetic network (SGN; <http://solgenomics.net/>) 之菸草 (*N. benthamiana*, Niben. Genome. v 0.4.4. proteins) 及番茄 (*Solanum lycopersicum*, ITAG2.3_proteins) 蛋白序列作為資料庫，進行蛋白身分鑑定。Mascot 分析設定如下：Fragment ion mass tolerance: 0.60 Da, parent ion tolerance: 7.0 PPM, fixed modification: carbamidomethyl of cysteine, variable modifications: oxidation of methionine 以及 phosphorylation of serine and threonine。

4.3.2 蛋白質身分鑑定標準依據

利用 Scaffold (version Scaffold_4.2.1, Proteome Software Inc., Portland, OR, USA) 分析 MASCOT 鑑定之 MS/MS-based 多肽鏈及蛋白之信度。其中 Scaffold 針對多肽鏈的身分鑑定低標為 95.0% probability (Peptide Prophet algorithm with Scaffold delta-mass correction)。另一方面，Scaffold 對蛋白身分鑑定標準有二，分別為 (1) >95.0% probability (Protein Prophet algorithm with Scaffold delta-mass correction) 及 (2) at least 2 identified peptides。

5. 生物資訊學分析 SISOBIR1 共免疫沉澱蛋白



5.1 基因註解

將 SISOBIR1 共免疫沉澱蛋白序列匯入 Blast2GO (BioBam Bioinformatics, Berlin, Germany) 軟體，根據 NCBI non-redundant 資料庫進行 Blastp (Blast Expect Value=1.0E-3)，接著根據序列比對結果進行基因註解分析。

6. SISOBIR1 共免疫沉澱蛋白功能性分析

6.1 TRV-mediated 基因靜默

6.1.1 基因靜默載體構築

TRV-mediated 基因靜默所採用之載體為 TRV1 (helper virus)與 TRV2-pYL279 載體構築策略如下：將候選基因之 DNA 序列於 SGN 進行 blastn 分析，蒐集序列相同度高於 60% 的序列，利用 **Clustal W** 進行多序列並列分析，針對 DNA 序列相同度高於 95% 之序列，設計基因靜默引子對，以增幅 300-500 bp 具專一性之序列。利用聚合酶鏈鎖反應增幅 DNA 片段，再利用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 萃取 DNA，並依據 pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 建議流程將目標 DNA 片段放入 pCR8 vector，再轉型入 *E. coli* (DH5 α)；接著以 50 ppm kanamycin LA 固態培養基進行篩選，挑選長出之菌落、萃取質體 DNA 進行定序分析後，利用 LR clonase II enzyme (Invitrogen) 於 25°C 進行 LR 反應，將目標片段轉接到 TRV2-pYL279 載體。最後將反應物轉殖至 *E. coli* (DH5 α)，以 100 ppm spectinomycin LA 固態培養基進行篩選，待菌落長出後，以 colony PCR 確認轉殖株。

6.1.2 農桿菌轉殖

將基因靜默重組載體利用液態氮冷凍法轉殖入農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101)。實驗流程為：將質體 DNA 和農桿菌勝任細胞

(GV3101)均勻混和，置入液態氮 30 秒後，轉置於 37°C 水浴 5 分鐘，接著加入 1 mL DYT (1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0)於 28°C 震盪培養 2-4 小時，以 8000 rpm 離心並移除部分上清液，將菌體重新懸浮後，塗抹於含有 50 ppm rifampicin 及 50 ppm kanamycin LA 固態培養基進行篩選培養，菌落長出後，利用 colony PCR 確認轉殖株。

6.1.3 農桿菌感染法 (Agroinfection)

進行基因靜默時，將攜帶 TRV2-pYC279 重組載體與攜帶 TRV1 的農桿菌培養於含有 50 ppm rifampicin 和 50 ppm kanamycin LA 固態培養基，待菌落長出後，繼代培養於含有 50 ppm kanamycin 之 LB 液態培養基在 28°C 生長 16 小時，將培養菌液與 MMA [10 mM MES, pH 5.6 (90 mM sodium phosphate buffer, 7 mM ammonium sulfate, 1.5 mM sodium citrate, 1 mM MgSO₄, 0.2% glucose, 0.1 mM CaCl₂), 10 mM MgCl₂, 200 mM acetosyringone]等體積混合，以 6000 ppm 離心 5 分鐘洗去 LB 中之抗生素與雜質，接著以 1 mL MMA 懸浮菌塊，並調整濃度為 OD₆₀₀=2 後，等體積混和帶有 TRV1 載體與 TRV2 重組載體的農桿菌菌液，再以針筒注射於兩週大的成熟菸草葉片，每株注射三片。

7. RNA 表現量分析

7.1 抽取植物 RNA

本實驗使用 plant RNA extraction miniprep Systemic Kit (Viogene, Sunnyvale, CA, USA)，相關實驗步驟均依據廠商建議流程進行。實驗中以 *PHYTOENE DESATURASE* (*PDS*)基因靜默植株作為參照組，收集基因靜默效果最好的三片葉片。將菸草葉片以液態氮研磨至粉末狀後置入微量離心管後，加入 450 µL RX buffer 並震盪均勻，隨後將混和後的液體倒入 shearing column 內，以 13000 rpm 離心 2 分鐘，小心吸起濾過之上清液，與 230 µL 100%酒精均勻混和再置入 mini column 中，以 10000 rpm 離心 1 分鐘，隨後加入 0.5 mL WF buffer 以 13000 rpm 離心 30 秒一次，再以 13000 rpm 離心 30 秒兩次，以清除殘留雜質，最後再以 13000 rpm

離心 3 分鐘以去除殘留酒精，最後以 50 μ L RNase-free ddH₂O 回溶 mini column 上之 RNA。



7.2 製備 cDNA

植物 RNA 以 TURBO DNA-free kit (Ambion, Huntingdon, UK) 依據 TURBO DNase 建議之操作流程進行去除 DNA。之後，取 1 μ g DNA-free RNA 以 SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 於 55°C 下，作用 2 小時下進行反轉錄。

7.3 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)

進行即時定量聚合酶連鎖反應所使用的儀器為 StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，使用之反應試劑為 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)。即時定量聚合酶連鎖反應分析是針對基因靜默基因設計引子對 (表一)，反應條件為：95°C /10 min, 96°C /15 sec, 60°C /1 min，共 40 個循環。增幅反應完成後，進行 melting curve (95°C /15 sec, 60°C /1 min, 95°C /15 sec) 分析。數據分析以 *N. benthamiana* ELONGATION FACTOR-1 α (NbEF-1 α) 作為 internal control 進行標準化，並與 TRV 對照組中之 RNA 表現量進行相對量 ($\Delta\Delta C_T$) 的計算。

7.4 ParA1 處理

在菸草葉片表現 ParA1 所採用之方法為農桿菌注射法，攜帶 pBI121-ParA1 之農桿菌調整為 OD₆₀₀=0.1，基因靜默植株挑選效果最好的三片葉片進行 ParA1 短暫表現，其方法為每片葉片隨機挑選四個位點注入直徑約 1 公分的圓形區域短暫表現 ParA1，並於表現 36 小時後觀察菸草葉片 necrosis 發生情形，再依據注入區域之細胞死亡面積所佔比例進行分級，1: 細胞壞死呈現 0-20% 注入面積，2: 細胞壞死呈現 20%-80% 注入面積，及 3: 細胞壞死呈現 20%-80% 注入面積；統計分析採用 Wilcoxon rank-sum test (*P<0.05, **P<0.01)。

參、 結果



1. 共表現 ParA1 導致 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 向植物細胞質移動

本實驗室先前發現以 ParA1 處理 *N. benthamiana* 葉片時，SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 會由細胞膜向細胞內移動。為探討收集葉片以進行免疫沉澱之最佳時間點，本研究利用農桿菌注射法於四週大之 *N. benthamiana* 葉片共表現: (1) SISOBIR1-GFP 與 ParA1；(2) SISOBIR1-like-GFP 與 ParA1；此外，另以 (3) SISOBIR1-GFP 與空載體 (pBI121; EV)及 (4) SISOBIR1-like-GFP 與 EV 作為對照組，並在表現蛋白後不同時間點利用雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察。結果發現，農桿菌注射 21 小時後，即可在未表現 ParA1 之對照組 [前述 (3)、(4)]觀測到 SISOBIR1-GFP 與 SISOBIR1-like-GFP 分布於細胞膜之螢光訊號 (圖一)；至第 23 小時，SISOBIR1-GFP 與 SISOBIR1-like-GFP 之螢光訊號更加明顯。相對的，若共表現 ParA1 時 [前述 (1)、(2)]，SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 雖於第 21 小時出現螢光訊號，但卻無法穩定分布於細胞膜，而是移動至細胞內之囊狀構造 (圖一，箭頭所示)，其中以 SISOBIR1-like-GFP 的移動現象尤其明顯；至第 23 小時，SISOBIR1-GFP 與 SISOBIR1-like-GFP 的螢光訊號逐漸減弱 (圖一)。此外，在三次重覆試驗中，SISOBIR1-like-GFP 的螢光訊號皆低於 SISOBIR1-GFP。這些結果顯示，以農桿菌注射共表現 ParA1，在第 21 小時即可見 SISOBIR1-GFP 與 SISOBIR1-like-GFP 由細胞膜向細胞內移動，但在第 23 小時螢光訊號逐漸減弱，因此後續進行免疫沉澱實驗時，選定 22 小時作為樣品收集的時間點。

2. 以免疫沉澱分離 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 在植物體內的交互作用蛋白

為確認 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 之表現情形，本實驗承接前述實驗之觀察結果，於農桿菌注射後 22 小時純化植物蛋白並進行免疫雜合法分析。其中，ParA1 處理組包括以農桿菌注射法共表現：(1) SISOBIR1-GFP 及 ParA1，(2)

SISOBIR1-like-GFP 及 ParA1；未處理組包括：(3) SISOBIR1-GFP 及 EV，(4) SISOBIR1-like-GFP 及 EV；此外，另以 (5) GFP 及 EV 和 (6) GFP 及 ParA1 作為對照組，以排除免疫雜合之非專一性訊號。將上述 (1), (2), (3)及(4)之粗萃蛋白以 anti-GFP 進行免疫雜合分析時，意外發現以 90°C 加熱粗萃蛋白再進行 SDS-PAGE，無法偵測到 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 的訊號，但將加熱溫度降低為 37°C 即可改善此現象。以免疫雜合分析各粗萃蛋白 [上述(1)至(6)]的結果顯示，在包含 SISOBIR1-GFP [前述 (1)及 (3)]或 SISOBIR1-like-GFP [前述 (2)及 (4)]之樣品中，皆可在相當於 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 預期分子量 (100 kDa)處偵測得訊號。然而在 55, 43 及 35 kDa 處另出現非預期訊號，其並未出現於前述 (5)或 (6)之對照組樣品 (圖二 A)。

進一步取各組別 [上述(1)至(6)]之定量粗萃蛋白，以 anti-GFP beads 免疫沉澱，再進行 SDS-PAGE。膠體染色結果顯示，無論共表現 SISOBIR1-GFP 與 ParA1 [前述 (1)]或 SISOBIR1-GFP 與 EV [前述 (3)]，皆可偵測到符合預期分子量 (100 kDa)之 SISOBIR1-GFP 蛋白，然而 72, 55, 43 kDa 處另出現非預期訊號，其同樣未出現於對照組樣品 [前述 (5)及(6)]；相對的，無論共表現 SISOBIR1-like-GFP 與 ParA1 [前述 (2)]或 SISOBIR1-like-GFP 與 EV [前述 (4)]，在預期分子量 (100 kDa)卻沒有預期訊號，反而在 55 kDa 處出現一主要條帶 (圖二 B)。進一步進行免疫雜合之結果顯示，除了在相當於 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 預期分子量處測得訊號外，另於 72, 55, 43 kDa 處出現非預期訊號，其亦未出現於對照組 [前述 (5)及(6)]樣品 (圖二 B)。然而，所有實驗組樣品 [前述 (1)至(4)]皆於 30 kDa 處，偵測到一蛋白訊號，其與對照組 [前述 (5)及(6)]樣品中偵測到的 GFP 分子量相符，顯示可能為 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 降解所釋出之 GFP。三次重複試驗結果顯示，ParA1 處理組 (1), (2)及未處理組 (3), (4)以 GFP-beads 進行免疫沉澱所得的免疫共沉澱蛋白，在 SDS-PAGE 電泳圖譜中具有再現性。另外，比對膠體染色及免疫雜合結果，推測 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 極可能與許多降解形式同時存在。另一方面，以定量之粗萃蛋白進行免疫沉澱，發現 SISOBIR1-like-GFP 在植物體中的蛋白累積量低於 SISOBIR1-GFP，可呼應 (圖一)的觀察結果；除此之外，Liebrand (2013)指出 SISOBIR1 在植物防禦機制扮演主要角色，故後續研究僅針對 SISOBIR1-GFP 進行免疫沉澱及質譜儀分析。

3. 利用 LC-MS/MS 辨識 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白

為瞭解與 SISOBIR1 交互作用之蛋白種類，本實驗以農桿菌注射法共表現：A. SISOBIR1-GFP 及 EV；B. SISOBIR1-GFP 及 ParA1；另以 C. GFP 及 EV 和 D. GFP 及 ParA1 作為對照組，並於注射 22 小時後收集樣品。以粗萃蛋白及 anti-GFP beads 進行免疫沉澱，接著利用液相層析串聯式質譜 (LC-MS/MS) 分析上述四個組別之免疫共沉澱蛋白。進行 LC-MS/MS 分析時，首先利用方法一，以 in-gel digestion 將免疫共沉澱蛋白酵解為多肽鏈，接著以 Waters Synapt G2 HDMS (台大化學系蛋白質體質譜核心實驗室) 進行 LC-MS/MS 分析，並將質譜數據以 MASCOT (Matrix Science, Version 2.3.02) 進行蛋白身分鑑定，然而此方法僅偵測得 SISOBIR1-GFP 及少數免疫共沉澱蛋白。為了減少免疫共沉澱蛋白的損失並增加分析靈敏度，方法二改為採取 on-bead digestion 進行蛋白酵解，並利用 Thermo LTQ Orbitrap XL (輔仁大學宗倬章先生紀念質譜儀實驗室) 進行 LC-MS/MS 分析，同樣以 MASCOT 分析質譜數據，進行蛋白身分鑑定，結果顯示，後者質譜分析所得之免疫共沉澱蛋白數量較為豐富，因此後續分析皆採用方法二。

本實驗共進行三重複獨立試驗，每次試驗皆以方法二分析上述 A, B, C 及 D 四組免疫共沉澱蛋白 (附圖一)。接著，利用 Scaffold 進一步彙整 MASCOT 蛋白身分鑑定的結果，以下述條件作為多肽鏈及蛋白之身分鑑定標準，其中，多肽鏈的身分鑑定低標為 95.0% probability (Peptide Prophet algorithm with Scaffold delta-mass correction) (Nesvizhskii *et al.*, 2003)；而蛋白身分鑑定標準有二，分別為 (1) 大於 95.0% probability (Protein Prophet algorithm with Scaffold delta-mass correction) 及 (2) 至少擁有 2 筆符合辨識標準的多肽鏈 (Keller *et al.*, 2002)。

為辨識可能專一性地與 SISOBIR1 交互作用之蛋白，本研究以 Scaffold 彙整單一重複試驗中 C 及 D 鑑定所得之免疫共沉澱蛋白作為對照組，並以 Venn diagram 中洋紅色的圓圈表示 (圖三 A, magenta circle)，以排除可能與 GFP 以及 anti-GFP beads 非專一性結合的蛋白。單一重複試驗中，分析 A 組所得的 SISOBIR1-GFP 共免疫沉澱蛋白以 Venn diagram 中黃色圓圈表示 (圖三 A, yellow circle)；分析 B 組所得的 SISOBIR1-GFP 共免疫沉澱蛋白則以 Venn diagram 中藍色圓圈表示 (圖三 A, blue circle)。Venn diagram 之區域 I, II 及 III 為僅專一性地與 SISOBIR1-GFP 共

免疫沉澱的蛋白 (圖三 A), I 代表未處理 ParA1 時, SISOBIR1 可能的交互作用蛋白; II 代表不論是否處理 ParA1, 皆可能與 SISOBIR1 交互作用的蛋白; III 代表處理 ParA1 時, SISOBIR1 可能的交互作用蛋白。另一方面, 出現於 IV, V, VI 區域中的蛋白, 不但與 SISOBIR1-GFP 共免疫沉澱, 亦同時在對照組被偵測到, 故為必須排除的非專一性蛋白 (圖三 A), 包括未處理 ParA1 時與 SISOBIR1-GFP 共免疫沉澱之非專一性蛋白 (IV); 不論是否處理 ParA1 皆與 SISOBIR1-GFP 共免疫沉澱之非專一性蛋白 (V); 處理 ParA1 時與 SISOBIR1-GFP 共免疫沉澱之非專一性蛋白 (VI)。最後, 區域 VII 則為僅單獨在對照組被偵測到的共免疫沉澱蛋白。

結果顯示, 對照組在三次重複試驗中分別偵測到 327, 323 及 241 筆非專一性蛋白 (圖三 B, C, D), 然而, 取其聯集, 本實驗共於對照組偵測得 391 筆非專一性蛋白, 顯示多數蛋白在三次重複試驗中具有再現性, 因此藉由對照組有助於排除每次試驗偵測到的非專一性蛋白。扣除與 GFP 非專一性結合的蛋白, SISOBIR1-GFP 在三次重複試驗中分別偵測到 54, 104, 55 筆免疫共沉澱蛋白 (圖三 B, C, D), 取其聯集, 共計得到 157 個 SISOBIR1 可能的交互作用蛋白 (表三), 其中 25 個蛋白僅出現於共表現 ParA1 的組別中, 顯示其可能為共表現 ParA1 時, 特別會與 SISOBIR1 交互作用之蛋白。此外, 本研究在三次質譜分析中, 亦偵測到數個已被證實會與 SISOBIR1 交互作用的 PRRs, 包含番茄 Eix2 以及 Ve proteins 之同源蛋白 (Liebrand et al., 2013; Fradin et al., 2014) (表三), 顯示以 *N. benthamiana* 為研究系統, 搭配免疫沉澱及質譜分析為探討 SISOBIR1 交互作用蛋白的有效策略。

4. SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白結合 Gene ontology (GO)之功能性分析

為瞭解 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白的功能特性, 本研究針對前述 157 筆蛋白資料進行 GO terms 分析。由於 *N. benthamiana* 之基因體資料庫目前尚未與 GO 資料庫連結, 本實驗利用 Blast2Go 軟體, 將 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白在 NCBI non-redundant database 進行 BLASTP 分析, 並依據分析結果取得各基因之 GO terms。

為進一步瞭解未處理 ParA1 時, SISOBIR1 之免疫共沉澱蛋白參與哪些

‘biological process’，本實驗針對未特定出現於 ParA1 處理組之 132 個 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白進行 GO terms 的合併分析，針對 Blast2GO Node-Score 最佳的前 10 個 GO terms 進行統計分析，進一步繪製 combined graph (圖四 A)。結果顯示，未處理 ParA1 時，SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白參與之 ‘biological process’，主要為 ‘metabolic process’ (層級二，biological process GO at level 2) 的分支 (65%)；此外，還有 ‘response to stimulus’ (18%)，‘cellular process’ 及 ‘single organism process’ (9%)，‘cellular component organization’ (8%) 的分支。包含於 ‘metabolic process’ 的 GO terms 包括：‘biosynthetic process’ (15%)，‘catabolic process’ (13%)，‘protein metabolic process’ (10%)，‘cellular metabolic process’ (9%)，‘carbohydrate metabolic process’ (9%)，以及 ‘nucleobase-containing compound metabolic process’ (9%)；包含於 ‘response to stimulus’ 的 GO terms 包括：‘response to stress’ (10%) 以及 ‘response to abiotic stimulus’ (8%)；包含於 ‘cellular process’ 及 ‘single organism process’ 的 GO term 為 ‘single-organism cellular process’ (9%)；最後，‘cellular component organization’ (8%) 則自為層級二之 GO term。這些結果顯示，未處理 ParA1 時，SISOBIR1 之免疫共沉澱蛋白可能多為 ‘metabolic process’ 之相關蛋白。

另一方面，為瞭解 ParA1 處理時，SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白參與哪些 ‘biological process’，本實驗針對特定出現於 ParA1 處理組之 25 個 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白進行 GO terms 的合併分析，再針對 Blast2GO Node-Score 最佳的前 10 個 GO terms 進行統計分析，並進一步繪製 combined graph (圖四 B)。結果顯示，ParA1 處理時，SISOBIR1 之免疫共沉澱蛋白在 ‘biological process’ 中主要為層級二之 ‘metabolic process’ (41 %) 以及 ‘response to stimulus’ (40%) 的分支；此外，還有 ‘biological regulation’ (9%) 之分支，以及 ‘response to stimulus’，‘cellular process’，‘single organism process’，‘biological regulation’，‘signaling’ (共 10 %)。包含於 ‘metabolic process’ 之 GO terms 包括：‘biosynthetic process’ (10%)，‘catabolic process’ (8%)，‘cellular metabolic process’ (8%)，‘nucleobase-containing compound metabolic process’ (8%)，以及 ‘organic substance metabolic process’ (7%)；包含於 ‘response to stimulus’ 之 GO terms 則包括：‘response to stress’ (20%)，‘response to endogenous stimulus’ (10%)，以及 ‘response to biotic stimulus’ (10%)；包含於 ‘biological regulation’ 為 ‘regulation of biological process’；最後，則是分屬於多個層

級二 GO terms 分支的 ‘signal transduction’ (10%)。

這些結果顯示，SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白參與的 ‘biological process’，主要可能為參與 ‘metabolic process’ 或 ‘response to stimulus’ 的相關蛋白。然而，ParA1 處理時，包含於 ‘metabolic process’ 的 GO terms 由 65% 降低至 41%，而包含於 ‘response to stimulus’ 的 GO terms 比例由 18% 提升至 40%，顯示共表現 ParA1 時，可能使 SISOBIR1 與抵抗刺激及逆境之相關蛋白產生交互作用，以利下游反應的啟動。

5. ParA1 處理時 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白之 GO term enrichment 分析

為瞭解因應 ParA1 處理，SISOBIR1 可能之交互作用蛋白的 GO terms 出現頻率是否發生變化，本實驗利用費雪檢定 (Fisher’s Exact Test)，進行 GO term enrichment 分析。以 157 個 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白作為參考母群體，並以 25 個 ParA1 處理時與 SISOBIR1 免疫共沉澱的蛋白為測試子群體進行 GO term enrichment 分析的結果顯示，共表現 ParA1 時，有三個 GO terms 出現頻率顯著提升，包括：‘response to endogenous stimulus’ (GO:0009719), ‘response to stress’ (GO:0006950)，以及 ‘cell communication’ (GO:0007154) (圖五)。其中，‘response to endogenous stimulus’ 及 ‘response to stress’ 皆為層級二 GO terms ‘response to stimulus’ 的分支，而 ‘cell communication’ 則同時為 ‘cellular process’ 及 ‘single-organism process’ 的分支。這些結果說明，以 ParA1 處理時，極可能提高植物體中 SISOBIR1 與反應刺激和逆境相關蛋白之交互作用情形，而另一 GO term ‘cell communication’ 出現頻率增加則顯示，ParA1 處理時可能提高 SISOBIR1 與植物調控外在環境交互作用之相關蛋白的交互作用情形。

6. 靜默 NbPDR1, NbPR10, NbOligoA, NbAraA2, NbGBLP，或 NbrbohB 緩降 ParA1 誘導之細胞壞死

為瞭解 SISOBIR1 共免疫沉澱蛋白在 ParA1 訊息傳導途徑之角色，本研究自前

述 157 個蛋白，依據目前對於 PTI 相關的背景知識，挑選 11 個本實驗中有興趣的基因作為供試基因並進行後續分析 (表三，表四)。首先，利用 TRV-mediated gene silencing 技術分別靜默各基因在 *N. benthamiana* 之基因表現量，接著短暫表現 ParA1 於基因表現量降低的 *N. benthamiana* 葉片，並透過觀察 ParA1 誘導細胞壞疽受影響的程度，以推測供試基因是否參與 ParA1 誘導過敏性反應途徑之重要性。

6.1 供試基因的挑選與命名

自表三所列蛋白清單挑選 11 個基因 (表四)，並根據各基因在 NCBI non-redundant database 進行 BLASTP 分析所得結果加以命名。NbS00012609g0009.1 屬於 guanine nucleotide binding protein (G protein) β subunit protein，為 *S. lycopersicum* AcrA2 (NP_001233881) 的同源性基因，命名為 *NbAcrA2* (表四)；NbS00000995g0010.1 也屬於 G protein β subunit protein，為 *Nicotiana glauca* NpGBLP (P93340.1) 之同源性基因，將其命名為 *NbGBLP* (表四)；NbS00038999g0004.1 為 *N. glauca* pleiotropic drug resistance protein 1 (PDR1, Q949G3) 之同源性基因，命名為 *NbPDR1* (表四)；NbS00003881g0105.1 為 *S. lycopersicum* predicted protein wall-associated receptor kinase (WAK)-like 20-like (XP_004252723.1) 的同源性基因，命名為 *NbWAK20-like* (表四)；NbS00008341g0001.1 為 *A. thaliana* 之 receptor like protein kinase S.2 (O48837.2) 之同源性基因，命名為 *NbLRKS2* (表四)；NbS00016866g0001.1 為 *Arabidopsis lyrata* alpha-glucan phosphorylase 2 (ATPHS2, XP_002877534.1) 之同源性基因，命名為 *NbATPHS2* (表四)；而 NbS00006294g0017.1 經序列比對後，發現即為 *N. benthamiana* *NbrbohB* (BAC56865.1) (表四)，靜默其基因表現時能延遲 *P. infestans* elicitor INF1 引發之細胞壞死 (Yoshioka *et al.*, 2003)；NbS00012670g0012.1 為 *S. lycopersicum* 之 predicted protein NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M 的同源性基因，命名為 *NbNDHM* (表四)；NbS00013102g0008.1 為 *S. lycopersicum* 之 predicted protein xylulose kinase-like (XP_004250720.1) 的同源性基因，命名為 *NbXK1* (表四)；NbS00061321g0003.1 為 *N. tabacum* 之 predicted protein PR-10 type pathogenesis-related protein (BAJ25770.1) 的同源性基因，命名為 *NbPR10* (表四)；最後 NbS00042478g0013.1 為 *S. lycopersicum* 之 predicted protein oligopeptidase A-like

的同源性基因，命名為 *NbOligoA* (表四)。



6.2 興趣基因靜默及 *ParA1* 誘導過敏性反應之功能性測試

將興趣基因之 DNA 序列以 SGN (Sol Genomic Network) *N. benthamiana* Genome v0.4.4 predicted cDNA 為資料庫進行 blastn 分析的結果發現，*NbXK1*、*NbPDR1*、*NbArcA2*、*NbNDHM*、*NbGBLP*、*NbrbohB* 及 *NbATPHS2* 在 *N. benthamiana* 中各具有一個相同度極高的同源性基因 (表四)，同時將各興趣基因的胺基酸序列以 SGN *N. benthamiana* Genome v0.4.4 predicted protein 為資料庫進行 blastp 分析，發現各興趣基因與其同源性基因的胺基酸序列相同度皆大於 85% (表四)。為避免同源基因之功能冗餘 (functional redundancy)，導致無法於功能性測試中呈現明顯表徵，故一併靜默上述供試基因及其同源性基因。其他供試基因，包含 *NbPR10*、*NbLRKS2*、*NbOligoA*，*NbWAK20-like* 因不具有同源性基因，因此僅專一性的靜默該基因。為專一性的靜默目標基因，本研究挑選基因靜默片段時，採取以下策略：將 11 個供試基因之 DNA 序列各自於 SGN 中以 *N. benthamiana* Genome v0.4.4 predicted cDNA 為 database 進行 blastn 分析，接著蒐集序列相同度高於 60% 的序列，以 **Clustal W** 進行多序列並列分析，最後針對序列歧異度高的 DNA 序列 (約 300-500 bp) 設計專一性引子對。其中，*NbXK1*、*NbPDR1*、*NbArcA2*、*NbNDHM*、*NbGBLP*、*NbrbohB* 及 *NbATPHS2* 雖然具有 2 個目標基因，但因其與各自同源性基因的 DNA 相同度極高，因此設計基因靜默片段時，挑選 2 個目標基因相同的 DNA 序列區域，但避開與其他基因保守性高的 DNA 序列區域，以便設計出專一性靜默 2 個目標基因之基因靜默片段。

依據上述分析結果，設計專一性引子對後，將增幅所得之目標基因片段構築入 TRV2-pYL279 載體，並轉殖入農桿菌 (GV3101) 中，另外，以帶有空載體 TRV2-pYL279 之 GV3101 作為對照組。接著，將帶有供試基因之 GV3101-TRV2 重組載體 (GV3101-TRV2:*NbXK1*、GV3101:TRV-*NbPDR1*、GV3101:TRV-*NbPR10*、GV3101:TRV-*NbLRKS2*、GV3101:TRV-*NbOligoA*、GV3101:TRV-*WAK20-like*、GV3101:TRV-*NDHM*、GV3101:TRV-*ArcA2*、GV3101:TRV-*NbGBLP*、GV3101:TRV-*NbrbohB*、GV3101:TRV-*ATPHS2*) 與 GV3101-TRV1 以 1:1 等體積混勻後，利用農桿菌感染法產生各目標基因之 *N. benthamiana* 基因靜默植株

(*TRV:nbxk1*、*TRV:nbpdr1*、*TRV:nbpr10*、*TRV:nblrks2*、*TRV:oligoa*、*TRV:wak20*、*TRV:ndhm*、*TRV:arca2*、*TRV:glbp*、*TRV:nbrbohB* 及 *TRV:atphs2*)，另一方面，使用農桿菌感染空載體 (GV3101-TRV2)與 GV3101-TRV1 為對照組 (TRV)。此外，利用基因靜默 *PHYTOENE DESATURASE (PDS)*之 *N. benthamiana* 植株 (*TRV:nbpds*)以確認全株性基因靜默之效果。*TRV:nbpds* 因 *PDS* 表現量下降導致植株及葉片白化，因其呈現的表徵明顯，因此本研究參照 *TRV:nbpds1* 植株葉片白化程度選定基因靜默效果最好的三片葉片為處理葉。接著，利用 qRT-PCR 分析供試基因在基因靜默植株及對照組 (TRV)之基因表現量的差異。其中，各供試基因的表現量以 *N. benthamiana ELONGATION FACTOR-1 α* (*NbEF-1 α*)作為 internal control 進行標準化。統計三次有興趣的基因靜默之重複試驗，顯示各興趣基因之 mRNA 累積量皆顯著下降 (圖六)。

之後，進一步於供試基因靜默之 *N. benthamiana* 葉片以農桿菌注射法短暫表現 ParA1。已知降低 *NbSOBIR1* 之表現量會緩解 ParA1 誘發之壞疽性病斑，因此以 *TRV:nbsobir1* 作為 positive control，另以 TRV 作為 negative control。透過比較 ParA1 在各基因靜默植株及 TRV 誘發之壞疽性病斑的發展程度，檢視供試基因是否參與 ParA1 誘導過敏性反應之途徑。首先，根據 ParA1 誘發壞疽性病斑的面積在農桿菌注射面積中的百分比將 ParA1 誘發的壞疽性病斑之發展程度由輕微至嚴重分為三個等級，依序為 '1': 壞疽性病斑面積占注入面積之 0-20%，'2': 壞疽性病斑面積占注入面積之 20%-80%，及 '3': 壞疽性病斑面積占注入面積之 80%-100% (圖七 A)。

接著，依據上述標準，分別在農桿菌注射 ParA1 後，第 36, 42, 60 小時觀察靜默供試基因是否影響 ParA1 誘發壞疽性病斑之發展程度，並進行統計分析的結果顯示，農桿菌注射 ParA1 後第 36 (附圖三)及 42 小時(圖七 B)，ParA1 於 *NbPDR1*、*NbPR10*、*NbOligoA*、*NbArcA2*、*NbGBLP*，*NBrbohB* 之基因靜默植株引發的細胞壞死程度相較於 TRV 植株皆顯著下降；然而，在 *NbXK1*、*NbLRKS2*、*NbWAK20-like*、*NbNDHM*，以及 *NbATPHS2* 之基因靜默植株引發之細胞壞死的程度則與 TRV 植株無顯著差異。至第 60 小時，ParA1 在大部分的供試基因之靜默植株 (*TRV:nbxk1*、*TRV:nbpr10*、*TRV:nblrks2*、*TRV:oligoa*、*TRV:wak20*、*TRV:ndhm*、*TRV:arca2*、*TRV:glbp*、*TRV:nbrbohB*，以及 *TRV:atphs2*)與 TRV 植株所引發的細胞死亡程度皆到

達等級 3，然而，基因靜默植株 *TRV:nbsobir1* 以及 *TRV:nbpdr1* 仍顯著延遲 ParA1 引發的細胞壞死程度（附圖三）。這些結果顯示，本實驗所挑選的候選基因中，*NbPDR1*、*NbPR10*、*NbOligoA*、*NbArcA2*、*NbGBLP* 及 *NbrbohB* 之基因靜默植株在農桿菌注射後第 36 及 42 小時皆顯著延緩 ParA1 引發的細胞壞死程度，其中，*NbPDR1* 基因靜默植株農桿菌注射 ParA1 後第 60 小時仍能延緩 ParA1 引發之細胞壞死，效果最為顯著。

肆、 討論



1. 以菸草分析 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 之免疫共沉澱蛋白

本實驗室先前的研究發現共表現 ParA1 能引發 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 由細胞膜向細胞內移動。以 TRV-mediated gene silencing 降低 *N. benthamiana* 中 *SISOBIR1* 之同源性基因 (*NbSOBIR1* homologs) 的表現量，能緩降 ParA1 引發之壞疽 (Peng *et al.*, unpublished)。以農桿菌注射法短暫表現 SISOBIR1-GFP 或 SISOBIR1-like-GFP 皆能回復靜默 *NbSOBIR1* homologs 減少 ParA1 所誘發壞疽情形，顯示番茄及菸草之 SOBIR1 同源性基因皆參與 ParA1 誘導壞疽的反應途徑，且兩者之 SOBIR1 具有功能上的保守性。相關研究顯示，RLKs 在基因及蛋白層次的研究往往可相互呼應，例如阿拉伯芥 BAK1 突變株失去接收 flg22 啟動 PTI 的能力 (Chinchilla *et al.*, 2007)，而蛋白層次的研究亦發現 flg22 處理後，BAK1 與 flg22 受器 FLS2 產生交互作用 (Heese *et al.*, 2007)。此外 BAK1 突變株失去接收 elf18 後啟動 PTI 的能力 (Chinchilla *et al.*, 2007)，而 elf18 處理後 BAK1 也會和 elf18 受器 ERF 交互作用 (Roux *et al.*, 2011)，說明探討 RLKs 之交互作用蛋白為瞭解其參與反應途徑之有效方法。因此，本研究利用共免疫沉澱搭配質譜儀分析 SISOBIR1 及 SISOBIR1-like 之交互作用蛋白，以進一步探討 ParA1 誘導 *N. benthamiana* 壞疽反應中與 SISOBIR1 及 SISOBIR1-like 相關之反應途徑。

為瞭解收集 *N. benthamiana* 葉片進行免疫沉澱之最佳時間點，本研究利用農桿菌注射法於四週大的 *N. benthamiana* 葉片共表現 SISOBIR1-GFP 及 ParA1 或 SISOBIR1-like-GFP 及 ParA1，並利用共軛焦顯微鏡觀察 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 在細胞之分布及移動的情形。結果發現共表現 ParA1 21 小時後 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 穩定表現，且開始由細胞膜移動至細胞內 (圖一)，其中 SISOBIR1-like-GFP 向胞內移動的現象尤為明顯，推測可能是因為 SISOBIR1-like-GFP 在細胞膜上訊號較弱，因此細胞中的螢光訊號可較清楚的被觀察到。共表現 ParA1 23 小時後，SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 的螢光訊號

減弱 (圖一)，顯示 ParA1 處理除了造成 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 移動，亦可能影響兩者在細胞中的蛋白穩定度 (Goh and Sorkin, 2013)。根據共軛焦顯微鏡觀察結果，以 22 小時作為後續蛋白樣品分析的時間點。

為確認 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 的表現情形，進行免疫沉澱及免疫雜合分析之結果發現，SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 可能與許多降解形式同時存在 (圖二)，此現象存在於許多螢光重組 RLPs 或 RLKs 的研究中 (Jonge *et al.*, 2012; Liebrand *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013a)，顯示 RLPs 及 RLKs 類的重組蛋白在植物體中可能容易產生不同的降解形式，但目前並不瞭解其降解原因。然而，共表現 ParA1 及 SISOBIR1-GFP 或 SISOBIR1-like-GFP 於基因靜默 *NbSOSBIR1* homologs 之葉片，可回復菸草因應 ParA1 引發之壞疽性病斑 (Peng *et al.*, unpublished)，顯示 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 在植物體中雖以不同的降解形態存在，但並不影響其在 ParA1 誘發壞疽反應途徑中的功能。相關研究顯示，SISOBIR1 在抗真菌性病害 *C. fulvum* 及 *V. dahlia* (Liebrand *et al.*, 2013) 及卵菌病害 *P. parasitica* (Peng *et al.*, unpublished) 的防禦反應中較 SISOBIR1-like 重要，因此後續質譜儀分析僅針對 SISOBIR1 進行探討。

2. 以質譜儀辨識 SISOBIR1 之交互作用蛋白

在番茄 RLP Cf4 的研究發現，以 *N. benthamiana* 為材料，搭配免疫沉澱及質譜分析發現其與 endoplasmic reticulum (ER)-quality control (QC) 相關蛋白交互作用，包含：ER heat shock protein70 (HSP70) binding proteins (BiP) 及 lectin-type calreticulins (CRTs) (Liebrand *et al.*, 2013)。此研究後續利用 TRV-mediated gene 靜默進一步探討 BiPs 及 CRTs 在菸草上的功能特性，發現降低 CRTs 表現量緩降 Cf-4 辨識 Avr4 引發之 HR，而基因靜默 BiPs 造成植株死亡而無法進一步分析。說明以 *N. benthamiana* 為表現系統，搭配免疫沉澱及質譜分析，為瞭解 RLPs/RLKs 訊息傳導途徑的有效策略。

本研究以類似的研究策略共發現了 157 個 SISOBIR1 可能的交互作用蛋白 (表三)，其中包含已知的 SISOBIR1 交互作用蛋白如 Eix 及 Ve proteins 在 *N. benthamiana* 之 homologs (Liebrand *et al.*, 2013; Fradin *et al.*, 2014)。已知 SISOBIR1 參與 Ve1 辨

識 Ave1 引發之過敏性反應 (Liebrand *et al.*, 2013)，且不同於 BAK1 與 PRRs 多在特定受體刺激時才產生交互作用 (Roux *et al.*, 2011)，SISOBIR1 與 Ve1 之交互作用與 Ave1 處理與否無關 (Jonge *et al.*, 2012; Liebrand *et al.*, 2013)。本研究發現，ParA1 處理與否並不影響 SISOBIR1 與上述兩 LRR-RLPs 之交互作用關係，說明 SISOBIR1 與 LRR-RLPs 交互作用的關係可能不會受到生物性刺激而改變。除了 Eix 及 Ve 的同源性基因外，我們另外找到七個具有 LRR domain 的 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白 (附表一)。其中兩個為 NbS00037616g0014.1 (NbSOBIR1a) 及 NbS00033954g0001.1 (NbSOBIR1b)，是 SISOBIR1 在菸草中的同源性序列，兩者胺基酸序列之相似度高達 88%，惟 NbSOBIR1b 之 kinase domain 的 C 端少了一小段胺基酸序列。由於 SISOBIR1 並不會形成 homodimer 或與 SISOBIR1-like 形成 heterodimer (Liebrand *et al.*, 2013)，因此理論上並不會與 *N. benthamiana* 中的 NbSOBIR1 或 NbSOBIR1-like 共免疫沉澱，所以極可能就是 SISOBIR1-GFP，然而由於 NbSOBIR1a 及 NbSOBIR1b 與 SISOBIR1 部分胺基酸序列保守，而在蛋白身分鑑定時判定為 NbSOBIR1a 及 NbSOBIR1b。至於其他五個具有 LRR domain 的免疫共沉澱蛋白，包含四個功能未知的 LRR-RLPs 及一個 LRR-RLK。由於 ParA1 在菸草中的受器目前仍未被證實，其是否包含 ParA1 的受器值得進一步探討。雖然在我們的質譜分析中，並沒有發現 ParA1 與 SISOBIR1 共免疫沉澱，顯示 SISOBIR1 可能沒有與 ParA1 的受器交互作用。然而，另一種可能性為 ParA1 與 SISOBIR1 形成蛋白複合體後，經由胞吞作用進入植物細胞，植物為了減低其可能對植物細胞造成的傷害，進而對 ParA1 進行 ubiquitination 等修飾作用以分解 ParA1，因此導致其質量改變，以致未出現於質譜分析結果，故 ParA1 及其受器及 SISOBIR1 之間的交互作用關係，仍然值得進一步研究。另一方面，第二次獨立試驗在未處理 ParA1 時，偵測到一 LRR-RLK (NbS00033946g0003.1) (附表一)，為一未知功能的阿拉伯芥 LRR-RLK (AT1G14390) 之同源性序列，兩者胺基酸序列相似度約為 62%。由於目前已知之 SISOBIR1 交互作用蛋白，皆為 LRR-RLPs，包含與番茄防禦相關的 Cfs, Eixs, Ve proteins 以及與生長發育相關的 SLCLV2, SITMM。此外，阿拉伯芥 SOBIR1 被發現參與 LRR-RLP RBPG1 辨識 PAMP endopolygalacturonases 引發壞疽的反應途徑中，且與 RBPG1 具有交互作用關係 (Zhang *et al.*, 2014)。SOBIR1 亦參與 LRR-RLP AtRLP30 辨識 SsE1 啟動下游 PTI 防禦反應的過程，然而，AtRLP30 與 SOBIR1 的交互作用關係

尚未被證實 (Zhang *et al.*, 2013b)。以 AtSOBIR1-YFP 轉植株進行免疫沉澱及質譜分析，發現一未知功能的 LRR-RLP AtRLP23 與 SOBIR1 共免疫沉澱；相較之下，並未發現 SISOBIR1 與任何 LRR-RLK 交互作用，目前 FLS2、BAK1 及 CLV1 皆被證實無法與 SISOBIR1 共免疫沉澱 (Liebrand *et al.*, 2013)，且阿拉伯芥 SOBIR1 不參與 FLS2 辨識 flg22 所啟動的反應途徑中 (Zhang *et al.*, 2013b)。這些研究顯示，SOBIR1 廣泛參與 LRR-RLPs 的反應途徑，且是許多 LRR-RLPs 共同的交互作用蛋白 (Liebrand *et al.*, 2014)。然而，本研究發現 *N. benthamiana* 中阿拉伯芥 LRR-RLK (AT1G14390) 之同源蛋白可能與 SISOBIR1 交互作用。由於，目前並未發現任何 LRR-RLKs 之 SOBIR1 交互作用蛋白，因此 LRR-RLKs 是否參與 SOBIR1 調控之反應是值得進一步探討的方向。

由於 elicitor 屬於 cysteine-rich protein，其蛋白結構具有三對影響構形的雙硫鍵，因此不易以 *E. coli* 進行表現與純化 (Hofzumahaus and Schallmeyer, 2013)，此外，以 *E. coli* 純化之 elicitor 活性較低，無法引發全面性的 PTI，尤其誘導 ROS 生合成的活性降低 (Chaparro-Garcia *et al.*, 2011; Hofzumahaus and Schallmeyer, 2013)。因此，本研究利用農桿菌注射法共表現 ParA1 及 SISOBIR1-GFP，探討 ParA1 處理時 SISOBIR1-GFP 的交互作用蛋白；同時利用共表現空載體 (EV) 及 ParA1，探討未處理 ParA1 時 SISOBIR1 的交互作用蛋白。雖然以共軛焦顯微鏡觀察最適合的樣品分析時間點，然而短暫表現蛋白的系統複雜，不但涉及植物本身的狀態，同時也與農桿菌與植物交互作用有關，因此即便固定時間點進行樣品收取再進行後續實驗，也很難得到相同的 SISOBIR1-GFP 及 ParA1 的表現情形，因此可能是造成 SISOBIR1-GFP 免疫共沉澱蛋白在處理或未處理 ParA1 時很難重複出現的原因 (表三 I, III)。然而，持續表現 ParA1 動態的系統雖造成質譜分析所偵測到的蛋白再現性不高，但是 ParA1 的持續表現可能使 SISOBIR1-GFP 處於不斷受刺激的狀態，因此本研究系統所偵測得到的 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白，可能包含剛活化或活化後期等不同活化時期之 SISOBIR1-GFP 交互作用蛋白，然而這些蛋白涉及交互作用的條件仍待後續實驗探討。值得注意的是，本研究雖然發現了 157 個 SISOBIR1 之候選交互作用蛋白，但免疫共沉澱蛋白與 bait protein 之間並不一定存在直接的交互作用關係 (Chang *et al.*, 2009)，因為辨識到的蛋白很可能只是與 SISOBIR1 有非直接的交互作用。因此，候選交互作用蛋白與 SISOBIR1 交互作用的關係，仍須

搭配其他實驗進一步驗證。



3. ParA1 處理時 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白的 GO terms 分布變化

目前關於 SOBIR1 及 SISOBIR1 交互作用蛋白的探討，多在未經特定處理時進行實驗 (Liebrand *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013b, 2014; Bi *et al.*, 2014)，而不瞭解 SISOBIR1 是否因應病原刺激而改變其交互作用的對象。本實驗發現的 157 個 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白中，有 25 個蛋白僅單一出現於共表現 ParA1 的處理組 (表三, III)，另外 132 個也出現於未共表現 ParA1 的處理組 (表三, I 或 II)。為分析一般狀態之 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白參與之 biological process，本研究針對前述 132 個 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白進行功能分析的結果發現，未處理 ParA1 時，SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白之 GO terms 比例最高的為 biosynthesis process (GO:0009058, 15%)，其次為 catabolic process (GO:0009056, 13%)，說明在未處理 ParA1 時，SISOBIR1 的交互作用蛋白可能多與 biosynthesis 及 catabolic 相關。相關研究指出，降低菸草 *SOBIR1* 同源性基因的表現量，造成短暫表現在菸草葉片之 Cf-4 及 Ve1 蛋白累積量下降，顯示 SISOBIR1 可能與 LRR-RLPs 的生合成或維持 LRR-RLPs 之蛋白穩定度相關 (Liebrand *et al.*, 2013)。然而，目前還不清楚 SOBIR1 造成 LRR-RLPs 累積量降低的詳細機制，因此 SOBIR1 是否透過與生物合成及代謝分解相關蛋白之交互作用，進而影響 LRR-RLPs 在植物體中的累積量值得進一步探討。

相較之下，25 個僅單一出現於共表現 ParA1 處理組的 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白的 GO term 分析結果顯示，biological process GO terms 比例最高的為 response to stress (GO:0006950, 20%)，之後則包括 response to biotic stimulus (GO:0009607, 10%)，response to endogenous stimulus (GO:0009719, 10%)，signal transduction (GO:0007165, 10%)，以及 biosynthetic process (GO:0009058, 10%)，其中 response to stress, response to biotic stimulus，及 response to endogenous stimulus 皆與植物因應逆境及生物性刺激的反應有關，說明 SISOBIR1 可能因應疫病菌外泌蛋白 ParA1 的處理而增加與防禦相關蛋白的交互作用，進而啟動下游的防禦反應。由於



SOBIR1 廣泛參與植物對抗不同病原的抗性反應，包含細菌 (Gao *et al.*, 2009)、真菌 (Liebrand *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013b, 2014)、病毒 (Tenório Costa, 2014)，以及卵菌 (Peng *et al.* unpublished)，因此推測 SOBIR1 可能在植物對抗不同病原時，參與 immune receptors 之下游防禦反應，而另一種可能性為 SOBIR1 調控 immune receptors 在細胞中的蛋白穩定度，進而影響植物對抗病原的能力。此外共表現 ParA1 時，與 signal transduction 相關之 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白的比例亦提高，說明 SISOBIR1 可能增加與防禦相關蛋白的交互作用，並透過增加與訊息傳導相關蛋白的交互作用，而影響下游防禦反應。然而，除了知道 SOBIR1 與許多 LRR-RLPs 交互作用外，目前並不瞭解 SOBIR1 在防禦反應中的是否具有其他交互作用蛋白，因此透過探討 SOBIR1 除了 LRR-RLPs 以外之交互作用蛋白，有助更全面地瞭解 SOBIR1 參與植物免疫的分子機制。

3.1 ParA1 處理時 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白的 GO terms enrichment 分析

為瞭解 ParA1 處理時 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白之 GO terms 出現頻率是否發生顯著改變，本研究以 25 個單獨出現於共表現 ParA1 處理組之蛋白為測試組 (test)，並以 157 個 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白為參照組 (reference) 分析的結果發現，3 個 GO terms 顯著改變，包括：response to endogenous stimulus (GO:0009719), response to stress (GO:0006950)，以及 cell communication (GO:0007154)。ParA1 處理屬於生物性刺激，然而，顯著提高之 GO terms 卻與抵抗逆境及內生性刺激的反應途徑相關，說明 ParA1 誘導過敏性之反應途徑中，SISOBIR1 參與的反應途徑可能與植物抵抗逆境及內生性刺激的下流反應途徑相似。研究顯示，SISOBIR1 在許多非生物性刺激中扮演重要角色，例如以強光處理阿拉伯芥的懸浮細胞的研究，SOBIR1 表現量大量上升 (González-Pérez *et al.*, 2011)；另一方面，突變阿拉伯芥 SOBIR1 降低植株對抗鹽濃度及抗殺草劑的容忍度 (Hove *et al.*, 2011)，兩者皆顯示 SOBIR1 參與植物抵抗逆境的過程。因此，生物或非生物逆境是如何啟動與 SISOBIR1 相關的反應途徑，以及 SISOBIR1 在生物及非生物性逆境中是否啟動相同的下流反應，皆是值得進一步探討的問題。

4. 供試基因在植物防禦反應中的生物意義

為瞭解 SISOBIR1 共免疫沉澱蛋白在 ParA1 訊息傳導途徑之角色，本研究以 TRV-mediated gene silencing 靜默目標基因後，利用農桿菌注射法在基因靜默葉片短暫表現 ParA1，並透過比較基因靜默植株與對照組 (TRV) 中 ParA1 引發壞疽性病斑之發展進程，以篩選參與 ParA1 誘發過敏性反應之 SISOBIR1 交互作用候選蛋白，以下針對參與 ParA1 誘導過敏性反應途徑之供試基因分別探討。

4.1 G proteins

Heterotrimeric G-proteins 為細胞膜 G-protein-coupled receptors 將訊息傳入細胞內的重要參與蛋白，主要由 G_α 、 G_β 、 G_γ subunits 三個 subunits 組合而成。當 G-protein-coupled receptors 與特定受體 (ligands) 結合後，將結合於 G_α 之 GDP 轉變為 GTP 進而活化 G protein，並啟動細胞內相關的反應途徑 (Temple and Jones, 2007; Chakravorty *et al.*, 2011)。植物的 Heterotrimeric G-proteins 亦參與許多 biological process 之反應途徑，包含植物免疫反應 (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2004)。阿拉伯芥基因體具有一個 G_α subunit (G PROTEIN α -SUBUNIT1, GPA1)、一個 G_β subunit (ARABIDOPSIS G PROTEIN β -SUBUNIT1, AGB1)，以及三個 G_γ subunits (ARABIDOPSIS G PROTEIN γ -SUBUNITs, AGG1, AGG2 及 AGG3) (Temple and Jones, 2007; Chakravorty *et al.*, 2011)。研究顯示，突變 G_β 及 G_γ subunits 導致阿拉伯芥抗 necrotrophic pathogen *Plectosphaerella cucumerina*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* 及 *Alternaria brassicicola* 的能力下降 (Trusov *et al.*, 2006, 2007, 2009)；另一方面，突變 G_α subunit 則使阿拉伯芥抗 *Plectosphaerella cucumerina* 之抗病能力上升。而 G_β 被發現參與 PTI 反應途徑 (Llorente *et al.*, 2005)，突變 G_β subunit 降低 flg22 及 elf18 引發之 ROS 生合成 (Ishikawa, 2009)。

阿拉伯芥 *BIR1* 突變株呈現快速細胞死亡的性狀，屬於負調控基因，透過篩選抑制 *BIR1* 突變株性狀的基因，發現突變 *BIR1* 所引發的細胞死亡能透過突變 *PAD4* 部分回復 (Gao *et al.*, 2009)；另外能在突變 *SOBIR1* 時完全回復，顯示 *SOBIR1* 及 *PAD4* 為 *BIR1* 調控之細胞死亡中，兩條不同的反應途徑 (Gao *et al.*, 2009)。以 *bir1-1pad4-1* 為背景，篩選互補其性狀的基因，發現一 G_β subunit 突變能完全回復

bir1-1pad4-1 部分細胞死亡的性狀 (Liu *et al.*, 2013), 顯示 AGB1 參與 BIR1 調控細胞死亡的途徑, 而 BIR1 突變株亦降低 PAMPs flg22, elf18 及 chitin 引發之 PTI 防禦反應 (Liu *et al.*, 2013)。進一步研究顯示, AGG1 及 AGG2 突變株接收 flg22, elf18 及 chitin 所引發之 PTI 防禦反應亦下降, 且 AGG1 及 AGG2 亦參與 BIR1 調控細胞死亡之反應途徑; 而突變 GPA1 則不影響上述 PAMPs 引發之 PTI 反應以及 BIR1 調控之細胞死亡 (Liu *et al.*, 2013)。由於 AGB1 及 AGG1 共同分布於細胞膜 (Adjobo-Hermans *et al.*, 2006), 顯示兩者可能與細胞膜之 RLKs SOBIR1, FLS2, EFR 及 CERK1 共同作用, 進而影響下游 PTI 反應 (Liu *et al.*, 2013)。然而 yeast two-hybrid 及 bifluorescence complementation analysis (BiFC) 並無法偵測到 SOBIR1, FLS2, EFR, CERK1 及 BAK1 之 kinase domain 與任何 G protein subunits 的交互作用 (Liu *et al.*, 2013), 顯示 RLKs 與 G proteins subunits 之交互作用可能需要其他蛋白的參與。

SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白共包含兩個 Guanine nucleotide binding protein (G protein) beta subunit proteins (NbS00012609g0009.1, NbS00000995g0010.1), 兩蛋白皆在第三次重複試驗被偵測到 (表三, 分類 II), 其胺基酸序列相同度約 74%, 雖具有相當的保守性, 但兩者在質譜分析所辨識到的 peptide 皆為 unique peptide, 並非其保守性序列, 顯示兩蛋白的確可能與 SISOBIR1 共免疫沉澱。其中, NbS00012609g0009.1 與 *S. lycopersicum* 之 ArcA2 有高達 84% 的胺基酸序列相似度, 故將其命名為 *NbArcA2*。ArcA (auxin-regulated gene from cultured cells) 最早在處理生長激素 (auxin) 之菸草 BY-2 細胞中被發現 (Ishida *et al.*, 1993), 相關研究顯示僅 auxin 處理能誘導 ArcA 之表現, phytohormones 及 CdCl₂ 的處理皆不誘導 ArcA 的表現 (Ishida *et al.*, 1996), 然而, 目前並未發現 ArcA 在植物免疫上的相關功能; 另一方面, NbS00000995g0010.1 在 *Nicotiana plumbaginifolia* 中具一胺基酸序列相似度高達 91% 的同源基因 *NpGBLP*, 故將其命名為 *NbGBLP*。利用 TRV-mediated gene silencing 並以農桿菌注射法表現 ParA1, 發現基因靜默 *NbGBLP* 及 *NbArcA2* 皆降低 ParA1 引發之壞疽 (圖七), 顯示上述 G β subunits 皆參與 SISOBIR1 相關之 ParA1 誘導壞疽反應途徑, 因此, 除了證實 G β subunits 在 SOBIR1 相關細胞死亡途徑扮演重要角色外, 本研究說明 G β subunits 可能與 SISOBIR1 共免疫沉澱, 進一步的實驗除了驗證 G β subunits 與 SISOBIR1 共免疫沉澱的關係外, G β subunits 與 SISOBIR1 之交互作用關係是否需要其他蛋白參與, 亦或僅在特別處理時交互作

用，皆值得進一步探討。



4.2 Pleiotropic drug resistance protein

ABC transporter 為一類龐大的 gene family，廣泛地存在於各種生物中，其蛋白質產物透過水解 ATP 提供能量進行物質之跨膜傳遞 (Higgins, 1992)。水稻及阿拉伯芥各具有超過 120 類的 ABC transporters (Theodoulou, 2000; Rea, 2007)，其中，Pleiotropic drug resistance (PDR) proteins 屬於 ABCG subfamily，為植物及真菌特有的 gene family (Crouzet *et al.*, 2013)，而阿拉伯芥及水稻基因體各具有 15 (Sánchez-Fernández *et al.*, 2001; Van den Brûle and Smart, 2002)及 23 個 PDR 基因 (Jasinski *et al.*, 2003; Crouzet *et al.*, 2006)。

遇生物性逆境時，植物 PDR 基因大量表現，例如在接收不同病原，包括：*A. brassicicola*, *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* 及 *P. syringae* pv. Tomato DC3000 時阿拉伯芥 *AtPDR12* 表現量提高，而逆境相關訊息傳導分子如 methyl jasmonate, ethylene 及 salicylic acid 亦能提高 *AtPDR12* 之表現量 (Campbell *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005)。另外，接種 *P. syringae* 後提高 *AtPDR8* (亦稱為 *PEN3*)之表現量，且阿拉伯芥 *AtPDR8* 突變株抵抗 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Erysiphe posii* 及 *Phytophthora infestans* 的抗病能力下降，顯示 *AtPDR8* 傳遞物質的功能在植物抵抗病原時扮演重要角色 (Glombitza *et al.*, 2004; Kobae *et al.*, 2006)。*Nicotiana tabacum* 懸浮培養細胞 Bright Yellow-2 (BY-2)處理 INF1 後，*NtPDR1* 表現量提高，而以 protein kinase inhibitor 處理可抑制 INF1 誘導之 *NtPDR1* 表現量上升 (Sasabe *et al.*, 2002)；相對的，處理 protein phosphatase inhibitor 則增加 *NtPDR1* 之累積量，顯示提升 *NtPDR1* 表現量為蛋白磷酸化之下游反應 (Sasabe *et al.*, 2002)。而 *N. plumbaginifolia* 之 *NpPDR1* 在接種 *Pseudomonas* strains 及處理逆境相關訊息傳導分子時，與 *AtPDR8* 表現量改變的模式相近 (Jasiński *et al.*, 2001; Stukkens *et al.*, 2005)。

本研究共發現兩個 Pleiotropic drug resistance protein 1 可能與 SISOIR1 共免疫沉澱，分別為 NbS00038999g0004.1 (*NbPDR1*，表三，3rd biological repeat, III)及 NbS00010523g0001.1 (表三，2nd biological repeat, III)，兩者之 DNA 相同度高達 96%，而胺基酸序列相似度為 89%，為避免功能冗餘，本研究在 TRV-mediated gene silencing 時一併靜默兩基因，結果顯示降低 *NbPDR1* 基因表現量 (圖六)，延緩農

桿菌注射 ParA1 後所誘導之壞疽效果顯著 (圖七)，甚至在農桿菌注射後 60 小時 ParA1 引發之壞疽皆明顯下降 (附圖三)，顯示 PDR1 參與 ParA1 引發壞疽。目前 PDR 的研究多侷限在特定處理時，探討 PDR 之表現量，尚未有任何研究顯示 PDR proteins 與 LRR-RLKs 之關聯性，因此進一步的實驗除了確認 NbPDR1 及 SISOBIR1 之交互作用的關係外，SISOBIR1 kinase domain 之活性是否影響 NbPDR1 之 mRNA 或蛋白之表現量亦值得進一步探討。

4.3 Reactive oxygen species (ROS) 生合成相關蛋白

植物接收生物性刺激後，啟動一連串的防禦反應，其中，ROS 的生合成為植物免疫重要的下游反應，不但可以直接抑制病原感染，在植物過敏性反應途徑中亦扮演重要角色 (O'Brien *et al.*, 2012)。NADPH oxidase 最早被發現於哺乳類之嗜中性球，主要包含兩個膜蛋白：gp91^{phox} 及 p22^{phox}。當動物細胞受刺激活化後，細胞膜上的 NADPH oxidases 會與細胞質內多個蛋白如 p47^{phox}, p67^{phox} 及小分子 G protein Rac 交互作用，進而活化並啟動下游反應 (Bokoch, 1994)。植物處理 diphenylene iodonium (NADPH oxidase inhibitor) 後，造成 ROS 生合成下降，顯示 NADPH oxidase 為影響 ROS 生合成重要的蛋白 (Levine *et al.*, 1994; Piedras *et al.*, 1998)。阿拉伯芥基因體包含 8 個參與不同反應途徑之 gp91^{phox} (respiratory burst oxidase homolog [*rboh*]) 基因，其參與之反應包含：生長、發育及植物免疫 (Torres *et al.*, 2002)。然而，除了 G protein Rac 外，阿拉伯芥並不具有 p22^{phox}, p47^{phox} 及 p67^{phox} 之同源性基因 (Dangl and Jones, 2001)，顯示植物 NADPH oxidase 調控 ROS 生合成之途徑可能與哺乳類動物不完全相同 (Torres and Dangl, 2005)。此外，相較於動物，植物 *rboh* 蛋白之 N 端多出兩個 EF hands，其為具有鈣離子結合能力之保守性構造 (Keller *et al.*, 1998)。然而，植物防禦反應中鈣離子濃度、*rboh*，及 ROS 之生合成相關的分子機制仍待進一步研究探討。

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 具有兩個 *rboh* homologs *StrbohA* 及 *StrbohB*，*Phytophthora* elicitor 及 SA 處理後 *StrbohB* 表現量大量上升，而 *StrbohA* 則不受影響 (Yoshioka *et al.*, 2001)。*N. benthamiana* 亦包含兩個 gp91^{phox} 之同源性基因，*NbrbohA* 及 *NbrbohB*，研究顯示以 INF1 處理能專一性的增加 *N brbohB* 之表現量 (Yoshioka *et al.*, 2003)。利用 TRV-mediated gene silencing 降低 *NbrbohB* 的表現量，

減低 INF1 引發之壞疽，顯示 *NbrbohB* 參與 INF1 引發之過敏性反應 (Yoshioka *et al.*, 2003)。此外，靜默 *NbrbohB* 基因，降低活化狀態 mitogen-activated protein kinase (MEK^{DD}，能持續活化下游 salicylic acid-induced protein kinase [SIPK] 及 wound-induced protein kinase [WIPK]，引發壞疽)所引發之過敏性反應 (Yoshioka *et al.*, 2003)；另一方面，過量表現 MEK^{DD} 增加 *NbrbohB* 之表現量，顯示 *NbrbohB* 參與 MAPK 相關之壞疽途徑且其生合成與 MAPK 相關反應途徑有關 (Yoshioka *et al.*, 2003)。

本實驗偵測到一可能與 SISOIR1 交互作用之 NADPH oxidase (NbS00006294g0017.1，表三，2nd biological repeats, III)，即為 *NbrbohB*，*N. benthamiana* 另包含一個與 *NbrbohB* 相似度極高的同源性基因 (NbS00020089g0010.1)，為了避免基因功能冗餘本實驗將兩基因同時靜默 (圖六)，結果發現減少 ParA1 誘發之壞疽(圖七)，顯示 *NbrbohB* 亦參與 ParA1 誘發之過敏性反應。*NbrbohB* 屬於膜蛋白，且參與 elicitor INF1 及 ParA1 誘導之壞疽途徑，故推測其很有可能在 elicitor 處理後與 SISOIR1 交互作用，進而影響下游 ROS 之生合成。接下來的實驗，除了進一步證實 *NbrbohB* 與 SISOIR1 之交互作用外，SISOIR1 kinase domain 的活性是否影響下游 ROS 生合成，以及細胞中鈣離子濃度與 SISOIR1 和 *NbrbohB* 交互作用的關聯性皆值得進一步探討。

4.4 防禦相關蛋白及其他

4.4.1 Pathogen related protein 10

植物 PR proteins 具有因應生物或非生物刺激而大量表現的特性，目前主要依據蛋白結構、血清學之關聯性，或其生物活性將 PR proteins 區分為 17 類 (Loon *et al.*, 1994; Sels *et al.*, 2008)，其中，PR10 為一類具有 Bet v 1 domain 之蛋白 (Midoro-Horiuti *et al.*, 2001)。目前 PR10 被發現參與生長、二次代謝，及抗微生物的反應途徑 (McGee *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004; Hashimoto *et al.*, 2004; Liu and Ekramoddoullah, 2006)，植物免疫相關實驗顯示，微生物、真菌 elicitor 及機械傷害處理時皆能誘導 PR10 之基因表現 (Somssich *et al.*, 1986; Walter *et al.*, 1990; Warner *et al.*, 1992)，然而，對於 PR10 在植物防禦反應中的功能以及所參與

之反應途徑瞭解有限 (Xu *et al.*, 2014)。辣椒 (*Capsicum annuum*) 相關研究顯示，轉錄因子 *WRKYb* 能與 *PR10* 之啟動子結合並活化辣椒之下游防禦反應 (Lim *et al.*, 2011)；Yeast two hybrid (Y2H)、BiFC 及 Co-IP 皆顯示 *PR10* 與 LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN1 (*LRR1*, cytoplasmic LRR containing protein, 具有 5 個 LRR repeats) 具有交互作用關係，在 *C. annuum* 及 *N. benthamiana* 之葉片過量表現 *PR10* 皆引發過敏性反應造成的壞疽性病斑，同時提高 *LRR1* 之表現量。進一步的實驗顯示，*LRR1* 增加 *PR10* 之 ribonuclease activity 且能磷酸化 *PR10*，為細胞死亡反應途徑中的正調控基因，而過量表現 *PR10/LRR1* 蛋白複合體亦能提高阿拉伯芥抵抗細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 及卵菌 *Hyaloperonospora arabidopsis* 之抗病能力，顯示 *PR10/LRR1* 蛋白複合體在過敏性反應及植物抗病機制中扮演重要角色 (Choi *et al.*, 2012)。

本研究發現一個具有 Bet v 1 domain 之 *PR10*-like protein (NbS00061321g0003.1, *NbPR10*，表三，3rd biological repeat, III)，以 TRV-mediated gene silencing 專一性的降低 *NbPR10* 之表現量 (圖六) 能減低 *ParA1* 誘導之壞疽 (圖七)，說明 *PR10* 參與 *ParA1* 誘導過敏性反應之反應途徑。相較於 *LRR1*，*SlSOBIR1* 亦為具有 5 個 LRR repeats 之蛋白，因此藉由進一步分析 *SlSOBIR1* 與 *LRR1* 之 LRR domain 的保守性序列及結構，可能可以幫助瞭解 *PR10* 與 LRR proteins 產生交互作用序列，並發現其他可能與 *PR10* 產生交互作用之 LRR proteins；然而，*SlSOBIR1* 屬於膜蛋白，其 LRR domain 多半位於細胞膜外，因此 *SlSOBIR1* 及 *PR10* 可能交互作用的位置及處理條件皆為值得進一步研究的方向。

4.4.2 Oligopeptidase A

本研究偵測到一個 oligopeptidase A-like protein (NbS00042478g0013.1, *NbOligoA*，表三，2nd biological repeat, II 及 3rd biological repeat, III)。*NbOligoA* 為阿拉伯芥 Thimet oligopeptidase TOP1 (At5g65620) 之同源性基因，兩者之胺基酸序列相似度高達 85%。阿拉伯芥 TOP1 及其 homolog TOP2 皆屬於 zincin-like metalloendopeptidases，為 SA 之交互作用蛋白，能與 SA 專一性結合 (Moreau *et al.*, 2013)。TOP1 及 TOP2 與 SA 結合後，peptidase 活性降低，然而目前並不瞭解 peptidase 活性在植物免疫中的功能 (Moreau *et al.*, 2013)。以 flg22 處理後，不影響 TOP1 基

因表現量，卻能提高 *TOP2* 之基因表現量，且此過程需具有正常功能之 *TOP1*，顯示 *TOPs* 可能共同參與 PTI 之反應途徑 (Moreau *et al.*, 2013)。此外，突變阿拉伯芥 *TOP1* 降低 *Pseudomonas syringae* DC3000 (*Pst*) *avrRpt2* 及 *Pst* *Rps4* 引發之細胞死亡 (Moreau *et al.*, 2013)；相反的，突變 *TOP2* 則增強 *Pst* *avrRpt2* 及 *Pst* *Rps4* 引發之細胞死亡，顯示 *TOP1* 為 *Pst* *avrRpt2* 及 *Pst* *Rps4* 誘導細胞死亡途徑中的正調控基因，而 *TOP2* 則屬於負調控基因 (Moreau *et al.*, 2013)。

本研究發現 *N. benthamiana* 中 *TOP1* 之同源性基因 *NbOligoA* 參與 *ParA1* 誘導之壞疽途徑。降低 *NbOligoA* 基因表現量，能延緩 *ParA1* 誘導壞疽之產生，顯示 *NbOligoA* 可能為 *ParA1* 誘導過敏性反應途徑中的正調控基因，進一步研究除了證實 *NbOligoA* 與 *SISOBIR1* 之交互作用關係外，LRR-RLK *SISOBIR1* 是否藉由與 *NbOligoA* 的交互作用進而啟動下游 SA 相關的反應途徑值得進一步探討。

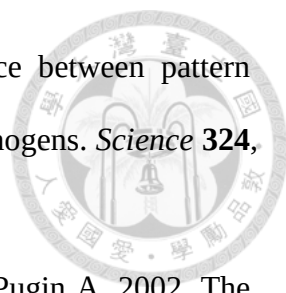
5. 結語

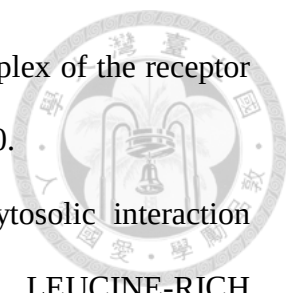
SISOBIR 及 SISOBIR1-like 參與 *P. parasitica* elicitor ParA1 誘導過敏性反應之反應途徑，其中 SISOBIR1 扮演主要角色。本研究以免疫沉澱搭配 LC-MS/MS 分析 SISOBIR1-GFP 之免疫共沉澱蛋白，共發現 157 個 SISOBIR1 可能的交互作用蛋白。針對 SISOBIR1 之免疫共沉澱蛋白進行 GO terms 分析的結果顯示，ParA1 處理顯著增加 SISOBIR1 與抵抗逆境 (GO:0006950, GO0009719) 及調控植物與外在環境交互作用 (GO:0007154) 等蛋白共免疫沉澱的頻率，說明 SISOBIR1 因應 ParA1 處理，可能與不同功能的蛋白交互作用，進而啟動相對應之下游反應。此外，由 157 個 SISOBIR1 可能的交互作用蛋白挑選 11 個供試基因，以 TRV-mediated gene silencing 搭配農桿菌注射 ParA1 篩選參與 ParA1 誘導壞疽反應途徑之調控基因，結果發現 6 個供試基因表現量下降時，緩降 ParA1 誘導壞疽，包含：*NbArcA2*, *NbGBLP* (G β subunits), *NbPDR1* (ABC transporter), *NbrbohB* (NADPH oxidase), *NbPR10* 及 *NbOligoA* (Oligopeptidase A-like protein)。其中降低 *NbPDR1* 表現量而減少 ParA1 誘導壞疽之效果最為顯著。後續實驗，除了驗證 SISOBIR1 與上述蛋白之交互作用關係外，其交互作用是否受到 SISOBIR1 kinase domain 活性的影響，以及其在細胞中交互作用發生的條件及作用位置皆需進一步探討，才能確認這些蛋白在 ParA1 作用途徑之角色。

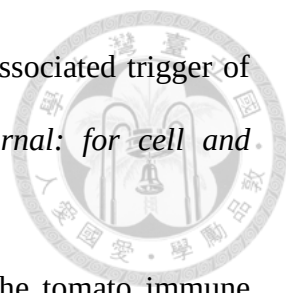
伍、 參考文獻



- Adjobo-Hermans MJW, Goedhart J, Gadella TWJ, 2006. Plant G protein heterotrimers require dual lipidation motifs of G_{α} and G_{γ} and do not dissociate upon activation. *Journal of Cell Science* **119**, 5087–5097.
- Afzal AJ, Wood AJ, Lightfoot DA, 2008. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 507–517.
- Bailey BA, 1995. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* **85**, 1250.
- Baldauf SL, Roger AJ, Wenk-Siefert I, Doolittle WF, 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972–977.
- Bar M, Sharfman M, Ron M, Avni A, 2010. BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *The Plant Journal* **63**, 791–800.
- Bi G, Liebrand TW, Cordewener JH, America AH, Xu X, Joosten MH, 2014. *Arabidopsis thaliana* receptor-like protein AtRLP23 associates with the receptor-like kinase AtSOBIR1. *Plant Signaling and Behavior* **9**, e27937.
- Bokoch GM, 1994. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **6**, 212–218.
- Boller T, Felix G, 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 379–406.

- 
- Boller T, He SY, 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* **324**, 742–744.
- Bourque S, Lemoine R, Sequeira-Legrand A, Fayolle L, Delrot S, Pugin A, 2002. The elicitor cryptogein blocks glucose transport in tobacco cells. *Plant Physiology* **130**, 2177–2187.
- Van den Brûle S, Smart CC, 2002. The plant PDR family of ABC transporters. *Planta* **216**, 95–106.
- Brunner F, Rosahl S, Lee J, 2002. Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *The EMBO Journal* **21**, 6681–6688.
- Campbell EJ, Schenk PM, Kazan K, 2003. Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**, 1272–1284.
- Chakravorty D, Trusov Y, Zhang W, 2011. An atypical heterotrimeric G-protein γ -subunit is involved in guard cell K^+ -channel regulation and morphological development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **67**, 840–851.
- Chang I-F, Curran A, Woolsey R, 2009. Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *PROTEOMICS* **9**, 2967–2985.
- Chaparro-Garcia A, Wilkinson RC, Gimenez-Ibanez S. 2011. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is required for basal resistance against the Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* **6**, e16608.

- 
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S., 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497–500.
- Choi DS, Hwang IS, Hwang BK, 2012. Requirement of the cytosolic interaction between PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN10 and LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN1 for cell death and defense signaling in pepper. *The Plant Cell* **24**, 1675–1690.
- Crouzet J, Roland J, Peeters E, 2013. NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport. *Plant Molecular Biology* **82**, 181–192.
- Crouzet J, Trombik T, Frayssé AS, Boutry M, 2006. Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Letters* **580**, 1123–1130.
- Dangl JL, Jones JD, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.
- Dardick C, Ronald P, 2006. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through Non-RD kinases. *PLoS Pathogens* **2**, e2.
- Dodds PN, Rathjen JP, 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539–548.
- Dou D, Kale SD, Wang X, 2008. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *The Plant Cell* **20**, 1930–1947.
- Erwin DC, Ribeiro OK, 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota, USA. 562.

- 
- Fellbrich G, Romanski A, Varet A., 2002. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **32**, 375–390.
- Fradin EF, Zhang Z, Rovenich H., 2014. Functional analysis of the tomato immune receptor Ve1 through domain swaps with its non-functional homolog Ve2. *PLoS ONE* **9**, e88208.
- Fritz-Laylin LK, Krishnamurthy N, Tör M, Sjölander KV, Jones JDG, 2005. Phylogenomic Analysis of the Receptor-Like Proteins of Rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**, 611–623.
- Gao M, Wang X, Wang D., 2009. Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in *Arabidopsis*. *Cell Host and Microbe* **6**, 34–44.
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E., 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711–724.
- Gaulin E, Dramé N, Lafitte C., 2006. Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *The Plant cell* **18**, 1766–1777.
- Gaulin E, Jauneau A, Villalba F, Rickauer M, Esquerré-Tugayé M-T, Bottin A, 2002. The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var-*nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *Journal of Cell Science* **115**, 4565–4575.
- Gijzen M, Nürnberger T, 2006a. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* **67**, 1800–1807.

Gijzen M, Nürnberger T, 2006. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* **67**, 1800–1807.

Glombitza S, Dubuis P-H, Thulke O, 2004. Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. *Plant Molecular Biology* **54**, 817–835.

Goh LK, Sorkin A, 2013. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, a017459.

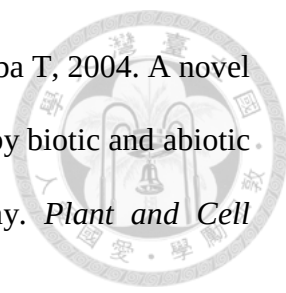
Göker M, Voglmayr H, Riethmüller A, Oberwinkler F, 2007. How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 105–122.

Gómez-Gómez L, Boller T, 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**, 1003–1011.

González-Pérez S, Gutiérrez J, García-García F, 2011. Early transcriptional defense responses in *Arabidopsis* cell suspension culture under high-light conditions. *Plant Physiology* **156**, 1439–1456.

Greeff C, Roux M, Mundy J, Petersen M, 2012. Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**, 209.

Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**, 393–398.

- 
- Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, Furukawa T, Komatsu S, Koshiba T, 2004. A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant and Cell Physiology* **45**, 550–559.
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, 2001. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* **127**, 803–816.
- Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12217–12222.
- Hein I, Gilroy EM, Armstrong MR, Birch PRJ, 2009. The zig-zag-zig in oomycete–plant interactions. *Molecular Plant Pathology* **10**, 547–562.
- Higgins CF, 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* **8**, 67–113.
- Hofzumahaus S, Schallmey A, 2013. *Escherichia coli*-based expression system for the heterologous expression and purification of the elicitor β -cinnamomin from *Phytophthora cinnamomi*. *Protein Expression and Purification* **90**, 117–123.
- Hove CA ten, Bochdanovits Z, Jansweijer VMA, 2011. Probing the roles of LRR-RLK genes in *Arabidopsis thaliana* roots using a custom T-DNA insertion set. *Plant Molecular Biology* **76**, 69–83.
- Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q, 2001. RESISTANCE GENE COMPLEXES: evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology* **39**, 285–312.

Ishida S, Takahashi Y, Nagata T, 1993. Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein beta subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 11152–11156.

Ishida S, Takahashi Y, Nagata T, 1996. The mode of expression and promoter analysis of the *arcA* gene, an auxin-regulated gene in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* **37**, 439–448.

Ishikawa A, 2009. The *Arabidopsis* G-protein beta-subunit is required for defense response against *Agrobacterium tumefaciens*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73**, 47–52.

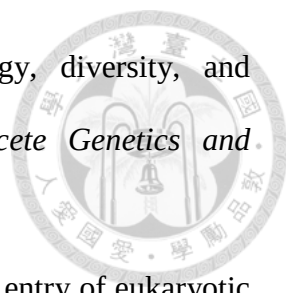
Jasinski M, Ducos E, Martinoia E, Boutry M, 2003. The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**, 1169–1177.

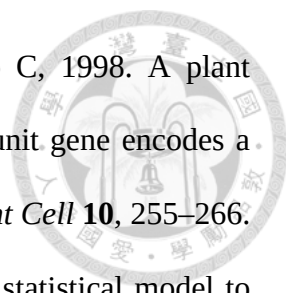
Jasiński M, Stukkens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand-Brynaert J, Boutry M, 2001. A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *The Plant Cell* **13**, 1095–1107.

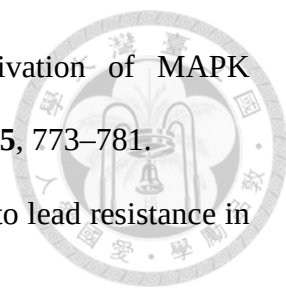
Jones JDG, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.

Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JD, 1994. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**, 789–793.

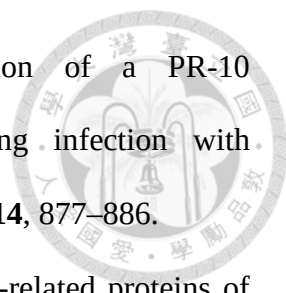
Jonge R de, Esse HP van, Maruthachalam K, 2012. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5110–5115.

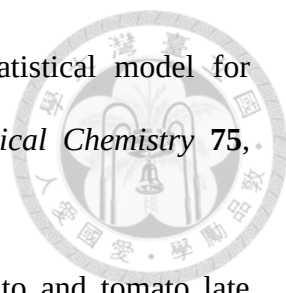
- 
- Judelson HS, 2009. Sexual reproduction in oomycetes: biology, diversity, and contributions to fitness. Lamour K, Kamoun S. *Oomycete Genetics and Genomics*. John Wiley and Sons, Inc., 121–138.
- Kale SD, Gu B, Capelluto DGS, 2010. External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* **142**, 284–295.
- Kamoun S, 2003. Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell* **2**, 191–199.
- Kamoun S, 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 41–60.
- Kamoun S, Klucher KM, Coffey MD, Tyler BM, 1993. A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Molecular plant-microbe interactions* **6**, 573–581.
- Kamoun S, van West P, de Jong AJ, de Groot KE, Vleeshouwers VGAA, Govers F, 1997. A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 13–20.
- Kanzaki H, Saitoh H, Ito A, 2003. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 383–391.
- Kanzaki H, Saitoh H, Takahashi Y, 2008. NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. *Planta* **228**, 977–987.

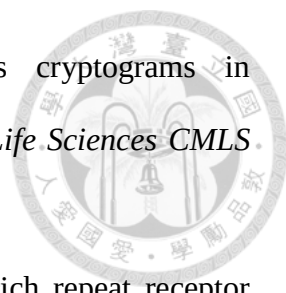
- 
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C, 1998. A plant homolog of the neutrophil NADPH Oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cell* **10**, 255–266.
- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R, 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Analytical Chemistry* **74**, 5383–5392.
- Kobae Y, Sekino T, Yoshioka H, Nakagawa T, Martinoia E, Maeshima M, 2006. Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant and Cell Physiology* **47**, 309–318.
- Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock AWAM, Govers F, 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* **102**, 348–364.
- Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology* **28**, 365–369.
- Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, Besson A, Pugin A, Wendehenne D, 2006. Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 1369–1376.
- Lamour K, Kamoun S, 2009. Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions and pesearch tools. John Wiley and Sons.
- Lamour KH, Stam R, Jupe J, Huitema E, 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* **13**, 329–337.

- 
- Lebrun-Garcia A, Ouaked F, Chiltz A, Pugin A, 1998. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *The Plant Journal* **15**, 773–781.
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y, 2005. AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**, 827–836.
- Lee S-J, Rose JK, 2010. Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins. *Plant Signaling and Behavior* **5**, 769–772.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C, 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583–593.
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC, 2002. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid Signaling. *Cell* **110**, 213–222.
- Liebrand TWH, Berg GCM van den, Zhang Z, 2013. Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 10010–10015.
- Liebrand TWH, van den Burg HA, Joosten MHJ, 2014. Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. *Trends in Plant Science* **19**, 123-132.
- Liebrand TWH, Smit P, Abd-El-Haliem A, 2012. Endoplasmic reticulum-quality control chaperones facilitate the biogenesis of Cf receptor-like proteins involved in pathogen resistance of tomato. *Plant Physiology* **159**, 1819–1833.

- 
- Lim JH, Park C-J, Huh SU, 2011. *Capsicum annuum* WRKYb transcription factor that binds to the CaPR-10 promoter functions as a positive regulator in innate immunity upon TMV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **411**, 613–619.
- Liou, R.F. 2001. Roles of elicitors in the biology of *Phytophthora*. *Plant Pathology Bulletin* **10**, 97-104
- Liu J, Ding P, Sun T, 2013. Heterotrimeric G Proteins Serve as a converging point in plant defense signaling activated by multiple receptor-like kinases. *Plant Physiology* **161**, 2146–2158.
- Liu J-J, Ekramoddoullah AKM, 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**, 3–13.
- Llorente F, Alonso-Blanco C, Sánchez-Rodríguez C, Jorda L, Molina A, 2005. ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *The Plant Journal* **43**, 165–180.
- Loon LC van, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V, 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**, 245–264.
- Mateos FV, Rickauer M, Esquerré-Tugayé MT, 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding an elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* that shows cellulose-binding and lectin-like activities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 1045–1053.

- 
- McGee JD, Hamer JE, Hodges TK, 2001. Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 877–886.
- Midoro-Horiuti T, Brooks EG, Goldblum RM, 2001. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* **87**, 261–271.
- Mikes V, Milat M-L, Ponchet M, Panabières F, Ricci P, Blein J-P, 1998. Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 133–139.
- Mikes V, Milat M-L, Ponchet M, Ricci P, Blein J-P, 1997. The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Letters* **416**, 190–192.
- Monaghan J, Zipfel C, 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 349–357.
- Moreau M, Westlake T, Zampogna G, 2013. The *Arabidopsis* oligopeptidases TOP1 and TOP2 are salicylic acid targets that modulate SA-mediated signaling and the immune response. *The Plant Journal* **76**, 603–614.
- Münch S, Lingner U, Floss DS, Ludwig N, Sauer N, Deising HB, 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology* **165**, 41–51.
- Nadeau JA, 2002. Control of Stomatal Distribution on the Arabidopsis Leaf Surface. *Science* **296**, 1697–1700.
- Nam KH, Li J, 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 203–212.

- 
- Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R, 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **75**, 4646–4658.
- Nowicki M, Foolad MR, Nowakowska M, Kozik EU, 2011. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease* **96**, 4–17.
- Nürnberg T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K, Scheel D, 1994. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449–460.
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Paul Bolwell G, 2012. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**, 765–779.
- Park C-J, Kim K-J, Shin R, Park JM, Shin Y-C, Paek K-H, 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **37**, 186–198.
- Peart JR, Lu R, Sadanandom A, 2002. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10865–10869.
- Perfus-Barbeoch L, Jones AM, Assmann SM, 2004. Plant heterotrimeric G protein function: insights from Arabidopsis and rice mutants. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 719–731.
- Piedras P, Hammond-Kosack KE, Harrison K, Jones JDG, 1998. Rapid, Cf-9- and Avr9-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 1155–1166.

- 
- Ponchet M, Panabières F, Milat M-L, 1999. Are elicitins cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. **56**, 1020–1047.
- Postel S, Küfner I, Beuter C, 2010. The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in *Arabidopsis* development and immunity. *European Journal of Cell Biology* **89**, 169–174.
- Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, 1997. Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH Oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *The Plant Cell* **9**, 2077–2091.
- Qutob D, Kamoun S, Gijzen M, 2002. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **32**, 361–373.
- Qutob D, Kemmerling B, Brunner F, 2006. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-Like proteins. *The Plant Cell* **18**, 3721–3744.
- Rea PA, 2007. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 347–375.
- Ricci P, Bonnet P, Huet JC, 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European journal of biochemistry* **183**, 555–563.
- Rivas S, Thomas CM, 2005. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 395–436.

Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, 2011. The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell* **23**, 2440–2455.

Russinova E, Borst J-W, Kwaaitaal M, 2004. Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3. *The Plant Cell* **16**, 3216–3229.

Sánchez-Fernández R, Davies TG, Coleman JO, Rea PA, 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 30231–30244.

Sasabe M, Takeuchi K, Kamoun S, 2000. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *European Journal of Biochemistry* **267**, 5005–5013.

Sasabe M, Toyoda K, Shiraishi T, Inagaki Y, Ichinose Y, 2002. cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Letters* **518**, 164–168.

Scheewe P, 1994. Identification of pathogenic races of *Phytophthora fragariae* Hickman in Germany. In: Schmidt H, Kellerhals M, eds. *Progress in Temperate Fruit Breeding*. Developments in Plant Breeding. Springer Netherlands, 67–71.

Schornack S, Damme M van, Bozkurt TO, 2010. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 17421–17426.

Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC, 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 941–950.

Shiu S-H, Bleecker AB, 2001. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10763–10768.

Simon-Plas F, Elmayan T, Blein J-P, 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal* **31**, 137–147.

Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K, 1986. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 2427–2430.

Stassen JH, Van den Ackerveken G, 2011. How do oomycete effectors interfere with plant life? *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 407–414.

Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D, Boutry M, 2005. NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiology* **139**, 341–352.

Tang W, Deng Z, Wang Z-Y, 2010. Proteomics shed light on the brassinosteroid signaling mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 27–33.

Temple BRS, Jones AM, 2007. The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 249–266.

Tenório Costa A, 2014. Molecular characterization and functional analysis of the receptor-like kinase SOBIR1 on tomato plants infected by a *Potyvirus*. In: Plant and Animal Genome.

Theodoulou FL, 2000. Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1465**, 79–103.

Thines M, Kamoun S, 2010. Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 427–433.

Torres MA, Dangl JL, 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 397–403.

Torres MA, Dangl JL, Jones JDG, 2002. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 517–522.

Trusov Y, Rookes JE, Chakravorty D, Armour D, Schenk PM, Botella JR, 2006. Heterotrimeric G proteins facilitate *Arabidopsis* resistance to necrotrophic pathogens and are involved in jasmonate signaling. *Plant Physiology* **140**, 210–220.

Trusov Y, Rookes JE, Tilbrook K, 2007. Heterotrimeric G protein β subunits provide functional selectivity in G_{β} dimer signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 1235–1250.

Trusov Y, Sewelam N, Rookes JE, 2009. Heterotrimeric G proteins-mediated resistance to necrotrophic pathogens includes mechanisms independent of salicylic acid-, jasmonic acid/ethylene- and abscisic acid-mediated defense signaling. *The Plant Journal* **58**, 69–81.

Tyler BM, 2007. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology* **8**, 1–8.

Tyler BM, Kale SD, Wang Q, 2013. Microbe-independent entry of oomycete RxLR effectors and fungal RxLR-like effectors into plant and animal cells is specific and reproducible. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 611–616.

Walter MH, Liu JW, Grand C, Lamb CJ, Hess D, 1990. Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. *Molecular and General Genetics* **222**, 353–360.

Wang Z-Y, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J, 2001. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**, 380–383.

Warner SA, Scott R, Draper J, 1992. Characterisation of a wound-induced transcript from the monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR) proteins. *Plant Molecular Biology* **19**, 555–561.

Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J, 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* **6**, 177–183.

Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**, 115–118.

Xu P, Jiang L, Wu J, Li W, Fan S, Zhang S, 2014. Isolation and characterization of a pathogenesis-related protein 10 gene (GmPR10) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. *Molecular Biology Reports* **8**, 4899-4909.

Yang M, Sack FD, 1995. The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **7**, 2227–2239.

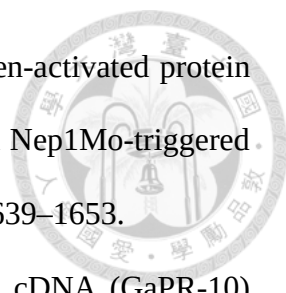
Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, 2003. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* **15**, 706–718.

Yoshioka H, Sugie K, Park H-J, 2001. Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 725–736.

Zhang Z, Fradin E, de Jonge R, 2013a. Optimized agroinfiltration and virus-induced gene silencing to study Ve1-mediated *Verticillium* resistance in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 182–190.

Zhang W, Fraiture M, Kolb D, 2013b. *Arabidopsis* RECEPTOR-LIKE PROTEIN30 and receptor-like kinase SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED mediate innate immunity to necrotrophic Fungi. *The Plant Cell* , tpc.113.117010.

Zhang L, Kars I, Essenstam B, 2014. Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the *Arabidopsis* receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES1. *Plant Physiology* **164**, 352–364.

- 
- Zhang H, Li D, Wang M, 2012. The *Nicotiana benthamiana* mitogen-activated protein kinase cascade and WRKY transcription factor participate in Nep1Mo-triggered plant responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 1639–1653.
- Zhou X-J, Lu S, Xu Y-H, Wang J-W, Chen X-Y, 2002. A cotton cDNA (GaPR-10) encoding a pathogenesis-related 10 protein with in vitro ribonuclease activity. *Plant Science* **162**, 629–636.
- Zipfel C, 2013. Combined roles of ethylene and endogenous peptides in regulating plant immunity and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 5748–5749.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**, 749–760.

附表



表一、用於構築 TRV-mediated 基因靜默載體之核酸引子

Table 1. Primers for the construction of vectors for TRV-mediated gene silencing

Primer name	Sequence (5'→3')	SGN ^a accession number of target gene
NbXK1-F	TCGCAAACGAAGAAGGTTCA	NbS00013102g0008.1
NbXK1-R	GTCCTTCCATGATTGTATCC	
NbPDR1-F	GGATCACAAGGTGCTGCTGC	NbS00038999g0004.1
NbPDR1-R	CAGTCATTTCTCCAATATGC	
NbPR10-F	ATTTCAGCCCCAAGAATGTT	NbS00061321g0003.1
NbPR10-R	CCTTCTATCAATGTATAAGC	
NbLRKS2-F	GAGGATGAAGTTTTAGGAAG	NbS00008341g0001.1
NbLRKS2-R	GTCTCCAATTGTTTCATGGAG	
NbOligoA-F	TTCTTACTGCTAGGACTTTT	NbS00042478g0013.1
NbOligoA-R	CGTTATGCCTAAGCAGCGGT	
NbWAK20-F	CTTATAAGATACGTTGCACT	NbS00003881g0105.1
NbWAK20-R	TACAAACTGGCTCCGGCGGC	
NbNDHM-F	TCTCAGTTTCAGCACAGCAA	NbS00012670g0012.1
NbNDHM-R	CAAACATCATCAGTAGGGTCA	
NbArcA2-F	GCCGGCTACGTGAACACCGTG	NbS00012609g0009.1
NbArcA2-R	GCTTGAGATCAACTTTAAGA	
NbGBLP-F	TGTCGCAAGAATCACTAGTA	NbS00000995g0010.1
NbGBLP-R	ACACTCACCCAAAGTGTTCC	
NbrbohB-F	CTTCTGTATTCTGCTTGGAAC	NbS00006294g0017.1
NbrbohB-R	TGGTGCGGATGATGATTTTC	
NbATPHS2-F	CTGCTAACAAGCAGGTATTAG	NbS00016866g0001.1
NbATPHS2-R	TGAGAAACCCTTTGAGCCAG	

^a. SGN: Sol Genetic Network.

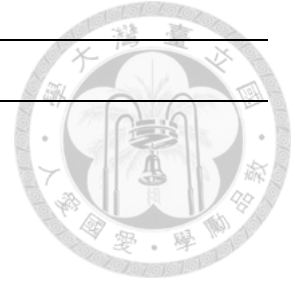
表二、即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應所使用之專一性引子對

Table 2. Primers for quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Primer name	Sequence 5'→3'	SGNa accession number of target gene
qNbXK1-F	CCCAGCTATTGCGTCCATTG	NbS00013102g0008.1
qNbXK1-R	TACAGGAACGGTCTAGACAA	
qNbPDR1-F	GGCTGCACTAGAAAAATTAC	NbS00038999g0004.1
qNbPDR1-R	CCAAGATCATCTACATCAAC	
qNbPR10-F	GCATAGGGTTGATGCTATTG	NbS00061321g0003.1
qNbPR10-R	ACCTTTACATCCTCCATCAG	
qNbLRKS2-F	ATGATACAGAAGGTATGCAG	NbS00008341g0001.1
qNbLRKS2-R	CCTAAACTTCATCCTCACT	
qNbOligoA-F	TTGGGTCAGAGCAAGCCAAT	NbS00042478g0013.1
qNbOligoA-R	TACAGCCTCCTTTATTTGCG	
qNbWAK20-F	AATGGCAGCCACTTTCCAGC	NbS00003881g0105.1
qNbWAK20-R	AAGGGACAGGAGAAGAGCCA	
qNbNDHM-F	TATGCAGCTTATATTGATCC	NbS00012670g0012.1
qNbNDHM-R	CCTCATAATGATCAACAAGT	
qNbArcA2-F	TGCAAATATAACCATTCAGGA	NbS00012609g0009.1
qNbArcA2-R	GAGTGGACCTCAGCTTACAG	
qNbGBLP-F	AAATTGTACTCGCTTGAGTC	NbS00000995g0010.1
qNbGBLP-R	GATCAACTTTCAAATCATCC	
qNrbobB-F	CAGAAAGCTATTGGTGGTTT	NbS00006294g0017.1
qNrbobB-R	TGGAGTTGCTAATGTAAATG	
qNbATPHS2-F	GACATGATGTTGTCTTTCCTG	NbS00016866g0001.1
qNbATPHS2-R	TCATATGCAATAGCCTGTAT	
qNbSOBIR1-F	GTTCACTGGAAAAATACCC	NbS00037616g0014.1
qNbSOBIR1-R	GTAACGTTTTTGGAAACGAAGTGC	
qNbEF1a-F	TGAGATGCACCACGAAGCTC	NbS00023178g0001.1

qNbEF1a-R CCAACATTGTCACCAGGAAGTG

^aSGN: Sol Genetic Network.



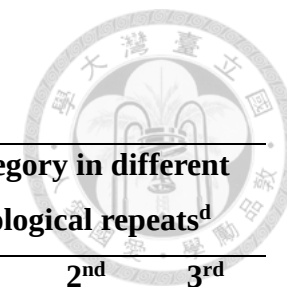


表 三、 SISOIR1-免疫共沉澱蛋白一覽表 ^a

Table 3. A list of proteins immunoprecipitated with SISOIR1^a

SGN ^b accession number	Protein description ^c	Category in different biological repeats ^d		
		1 st	2 nd	3 rd
NbS00001586g0015.1	2-isopropylmalate synthase		I	I
NbS00003881g0105.1	wall-associated receptor kinase-like 20-like	II	II	II
NbS00059006g0010.1	Glutathione S transferase zeta class	II	II	II
NbS00026249g0019.1	Arginyl tRNA synthetase	II	II	II
NbS00008036g0006.1	lysm domain receptor-like kinase 4-like	II	II	II
NbS00019265g0001.1	Chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic	II	II	II
NbS00022338g0002.1	Alpha glucan phosphorylase H isozyme	II	II	II
NbS00007615g0209.1	gdp-d-mannose pyrophosphorylase	II	II	II
NbS00025906g0010.1	Proline rich receptor protein kinase PERK1	II	II	II
NbS00037616g0014.1	Leucine rich repeat receptor serine/threonine/tyrosine protein kinase SOBIR1	II	II	II
NbS00005977g0009.1	Vacuolar cation/proton exchanger	II	II	II
NbS00019983g0006.1	3-oxoacyl Acyl carrier protein synthase II	II	II	
NbS00001701g0106.1	26s proteasome regulatory subunit 4 homolog a-like	II	II	

NbS00016866g0001.1	Alpha glucan phosphorylase H isozyme	II	II	
NbS00004638g0012.1	DnaJ/Hsp40 cysteine rich domain	II	II	
NbS00001134g0002.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Eix2 homolog)	II	II	
NbS00016695g0014.1	DNAJ chaperone	II	II	
NbS00026116g0017.1	Rhodanese related sulfurtransferase	II	II	
NbS00042462g0004.1	Alpha/beta hydrolase fold protein	II	II	
NbS00008028g0022.1	Chaperone protein dnaJ	II	II	
NbS00013102g0008.1	xylulose kinase	II	II	
NbS00032876g0004.1	Glutathione S transferase domain protein	II	II	
NbS00023195g0011.1	Vacuolar cation/proton exchanger	II	II	
NbS00007615g0210.1	pyrroline-5-carboxylate synthetase	II	II	
NbS00013023g0001.1	Aminomethyltransferase mitochondrial		II	II
NbS00047628g0009.1	Aldehyde dehydrogenase expressed		II	II
NbS00033260g0005.1	Glutathione S transferase domain protein		II	II
NbS00039979g0001.1	Mitochondrial carrier protein		II	II
NbS00017789g0029.1	Proline rich receptor protein kinase PERK1		II	II
NbS00006365g0017.1	Elongation factor Tu		II	II
NbS00047057g0006.1	Serine hydroxymethyltransferase mitochondrial	II		II



NbS00010213g0014.1	Cysteine desulfurase 2, chloroplastic
NbS00061418g0005.1	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit
NbS00008099g0224.1	probable glutathione s-transferase-like
NbS00022740g0004.1	Cytochrome P450
NbS00008099g0223.1	probable glutathione s-transferase-like
NbS00012670g0012.1	NADPH quinone oxidoreductase subunit M
NbS00010241g0007.1	ATP synthase beta subunit
NbS00003163g0002.1	Ribulose biphosphate carboxylase large chain
NbS00015167g0017.1	Glucose-6-phosphate isomerase
NbS00049661g0007.1	glutathione S transferase
NbC26208175g0003.1	Cathepsin B cysteine proteinase
NbS00033946g0003.1	Receptor kinase
NbS00019115g0001.1	Aspartic proteinase nepenthesin I
NbS00021769g0027.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP
NbS00023444g0014.1	Ethanolamine phosphate cytidyltransferase
NbS00033465g0001.1	Cell division protease FtsH
NbS00052782g0001.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP
NbS00033954g0001.1	Leucine rich repeat receptor serine/threonine/tyrosine protein kinase SOBIR1

III

III



III

III

I

I

I

I

I

I

I

I

I

I

I

I

I

NbS00032542g0014.1	ABC transporter B family member 28	
NbS00046603g0005.1	Acetyl CoA carboxylase	
NbS00018872g0014.1	Acetyl CoA carboxylase	
NbS00004472g0004.1	Serine glyoxylate aminotransferase	
NbS00002134g0112.1	60s ribosomal protein l9-1-like	I
NbS00007111g0015.1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1	I
NbS00000674g0015.1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	I
NbS00000164g0014.1	Pyruvate kinase cytosolic isozyme	I
NbS00008187g0001.1	NADP binding Rossmann fold	I
NbS00000980g0006.1	30S ribosomal protein	I
NbS00000172g0008.1	Mitochondrial-2-oxoglutarate/malate carrier protein	II
NbS00009106g0015.1	NADP binding Rossmann fold	II
NbS00006322g0005.1	Cysteine synthase	II
NbS00012133g0014.1	26S protease regulatory subunit 7A	II
NbS00039716g0007.1	Hydrolase alpha/beta fold	II
NbS00012577g0009.1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase	II
NbS00003774g0005.1	GDP-D-mannose pyrophosphorylase	II
NbS00028552g0005.1	Rhodanese related sulfurtransferase	II



NbS00019830g0005.1	Rhodanese protein Fragment	II
NbS00011168g0004.1	26S protease regulatory subunit 6B	II
NbS00022823g0015.1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	II
NbS00003128g0012.1	Aspartic proteinase nepenthesin	II
NbS00019874g0005.1	Cell division protein FtsZ	II
NbS00020259g0004.1	Nuclear envelope protein	II
NbS00037550g0004.1	3-oxoacyl-Acyl-carrier protein synthase 2	II
NbS00005430g0008.1	ATP synthase delta subunit	II
NbS00008753g0010.1	Chaperone protein dnaj	II
NbS00007213g0011.1	DNAJ chaperone	II
NbS00006179g0007.1	3-ketoacyl CoA thiolase-2-peroxisomal	II
NbS00003287g0001.1	Mitochondria-2-oxoglutarate/malate carrier protein	II
NbS00003586g0006.1	probable leucine-rich repeat receptor-like protein at1g35710-like	II
NbS00008692g0009.1	Diacylglycerol kinase	II
NbS00051139g0006.1	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 3	II
NbS00000749g0003.1	Pyruvate kinase cytosolic isozyme	II
NbS00021709g0005.1	Aldehyde dehydrogenase family 3 member F1	II
NbS00013496g0008.1	Glutamyl tRNA ^{Gln} amidotransferase subunit A, chloroplastic/mitochondrial	II



NbS00003584g0003.1	Coatomer alpha subunit protein	II
NbS00026313g0011.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Ve homolog)	II
NbS00009714g0008.1	Palmitoyltransferase	II
NbS00002201g0002.1	V type proton ATPase subunit H	II
NbS00006484g0005.1	ATP synthase subunit b	II
NbS00011043g0012.1	26S protease regulatory subunit 8 A	II
NbS00015174g0003.1	Hydroxycinnamoyl Coenzyme A shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase	II
NbC25032573g0001.1	ATP dependent Zn protease cell division protein FtsH	II
NbS00043545g0007.1	Coatomer protein epsilon subunit	II
NbS00031150g0002.1	Vacuolar ATP synthase subunit D	II
NbS00008607g0001.1	Ankyrin repeat	II
NbS00021169g0106.1	premnaspirodiene oxygenase-like	II
NbS00042625g0013.1	Alpha-1 4-glucan phosphorylase-L-1-isozyme	II
NbS00002537g0011.1	Membrane protein	II
NbS00003034g0107.1	phospholipid-transporting atpase 9-like	II
NbS00024693g0004.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Eix2 homolog)	II
NbS00047836g0002.1	Mitochondrial import inner membrane translocase	II
NbS00012865g0002.1	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase	II



NbS00058919g0010.1	Genomic DNA chromosome 5 P1 clone MKP11/rubredoxin family protein	II
NbS00052496g0021.1	Formate tetrahydrofolate ligase	II
NbS00044893g0007.1	26S protease regulatory subunit 7	II
NbS00000995g0010.1	Guanine nucleotide binding protein beta subunit protein	II
NbS00004679g0009.1	Calcium binding protein Calnexin	II
NbS00012609g0009.1	Guanine nucleotide binding protein beta subunit protein	II
NbS00043817g0003.1	ATP citrate lyase a subunit	II
NbS00017142g0001.1	Isocitrate dehydrogenase	III
NbS00019384g0017.1	Bifunctional inhibitor/lipid transfer protein/seed storage 2S albumin	III
NbS00009266g0009.1	Acyltransferase	III
NbS00006294g0017.1	Respiratory burst oxidase protein	III
NbS00029167g0003.1	Glutathione S transferase protein	III
NbS00000482g0006.1	G type lectin S receptor serine/threonine protein kinase B120	III
NbS00003675g0003.1	NADH dehydrogenase protein	III
NbS00008341g0001.1	Receptor kinase	III
NbS00010523g0001.1	Pleiotropic drug resistance protein 1	III
NbS00062047g0006.1	Glutathione S transferase protein	III
NbS00007007g0003.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Ve homolog)	III





NbS00011572g0004.1	Acetyl CoA carboxylase biotin carboxylase			III
NbS00018357g0005.1	Peroxisomal fatty acid beta oxidation multifunctional protein			III
NbS00016355g0001.1	Formate dehydrogenase mitochondrial			III
NbS00032243g0025.1	Cytochrome P450			III
NbC24101312g0001.1	Photosystem I reaction center subunit V			III
NbS00026051g0013.1	60S ribosomal protein L13			III
NbS00061321g0003.1	Major allergen, Mal d 1			III
NbS00050159g0001.1	Photosystem I reaction center subunit V			III
NbS00038999g0004.1	Pleiotropic drug resistance protein 1			III
NbS00032878g0001.1	6-phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating	I		II
NbS00023916g0005.1	Phosphoglucomutase		II	I
NbS00024487g0013.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Eix2 homolog)	III		II
NbS00039543g0002.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP	III	II	
NbS00019972g0004.1	Alpha-1-4-glucan phosphorylase	II	II	III
NbS00007051g0004.1	Cytochrome P450 NADPH reductase		III	II
NbS00042478g0013.1	Oligopeptidase A		II	III
NbS00003665g0003.1	Cytochrome P450		II	III
NbS00005233g0108.1	glutathione transferase 10	III	II	II

表 四、後續探討參與 ParA1 誘導過敏性反應之菸草候選基因列表

Table 4. A list of genes analyzed for their roles in ParA1-induced necrosis in *Nicotiana benthamiana*

Gene name	SGN ^a accession number	Gene description ^b	Homologous gene identified in SGN	Coverage DNA/protein (%)	DNA identity (%)	Protein identity (%)
NbXK1	NbS00013102g0008.1	xylulose kinase 1	NbS00029454g0022.1	85/99	96	89
NbPDR1	NbS00038999g0004.1	Pleiotropic drug resistance protein 1	NbS00010523g0001.1	96/99	95	89
NbPR10	NbS00061321g0003.1	Major allergen Mal d 1	-	-	-	-
NbLRKS2	NbS00008341g0001.1	Receptor kinase	-	-	-	-
NbOligoA	NbS00042478g0013.1	oligopeptidase A	-	-	-	-
NbWAK20-like	NbS00003881g0105.1	Wall-associated kinase 20-like	-	-	-	-
NbNDHM	NbS00012670g0012.1	NADPH quinone oxidoreductase subunit M	NbS00018341g0002.1	96/97	95	85
NbArcA2	NbS00012609g0009.1	Guanine nucleotide binding protein beta subunit protein	NbS00044393g0011.1	100/100	97	90
NbGBLP	NbS00000995g0010.1	Guanine nucleotide binding protein beta subunit protein	NbS00035737g0006.1	98/100	98	91
NbrbohB	NbS00006294g0017.1	Respiratory burst oxidase protein	NbS00020089g0010.1	100/67	96	90
NbATPHS2	NbS00016866g0001.1	Alpha glucan phosphorylase H isozyme	NbS00022338g0002.1	81/92	96	95

^a. SGN: Sol Genetic Network.

^b. Gene description as shown in SGN for each accession.

附圖

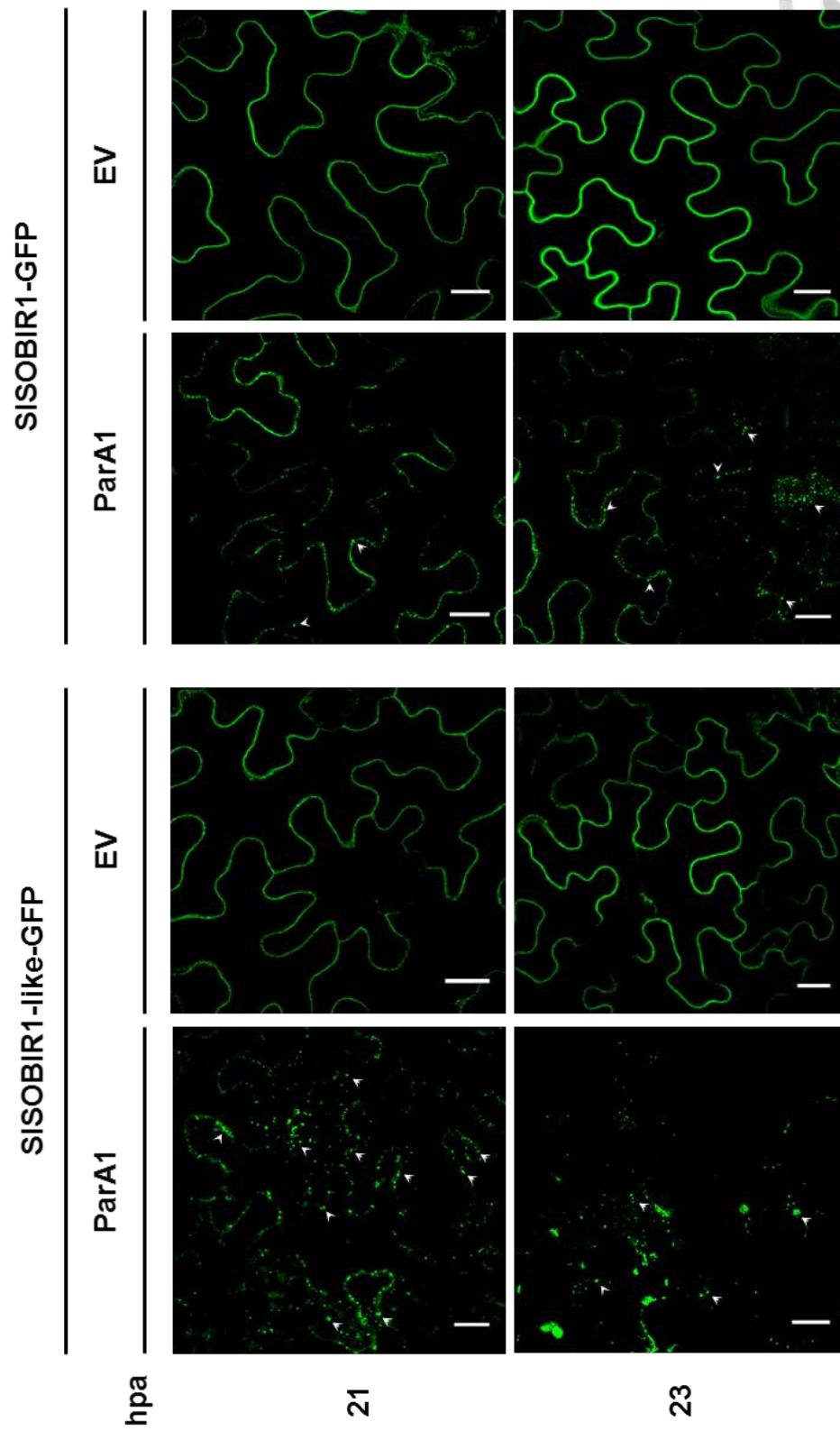
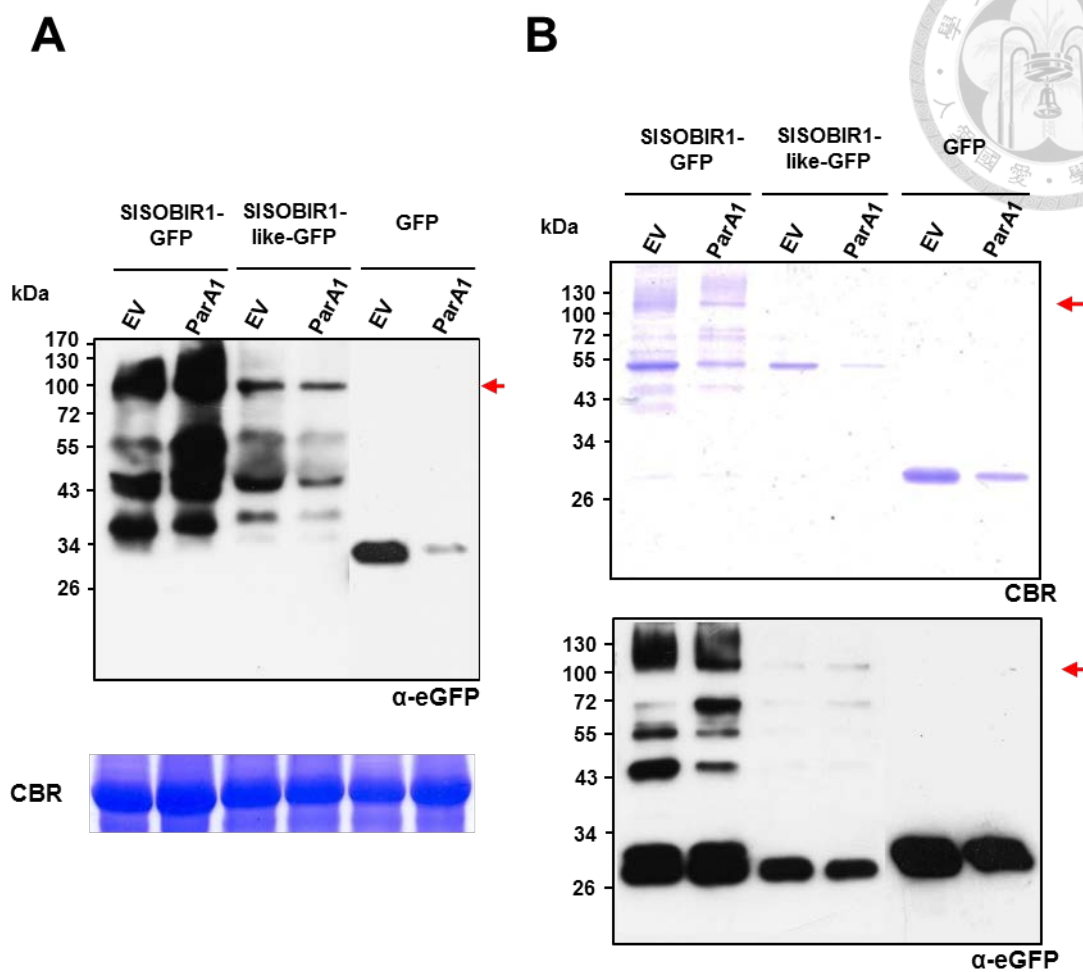


圖 一、 ParA1 導致 SISOBIR1-GFP 向植物細胞質之囊狀構造移動

Figure 1. SISOBIR1-GFP and SISOBIR1-like-GFP moved to vesicle-like structures in the plant cytoplasm in response to ParA1 treatment.

Agrobacterium tumefaciens harboring the ParA1 expression construct [or the empty vector (EV) as a control] was coinfiltrated with *A. tumefaciens* carrying the SISOBIR1-GFP or SISOBIR1-like-GFP expression construct into leaves of four-week-old *Nicotiana benthamiana*. At 21 or 23 h post-agroinfiltration (hpa), subcellular localization of the GFP-fusion proteins was examined by confocal microscopy. Scale Bar=50 μ m. White arrows indicate vesicle-like-structures in the cytoplasm.





圖二、免疫雜合分析 SISOBIR1-GFP 及 SISOBIR1-like-GFP 之免疫共沉澱蛋白

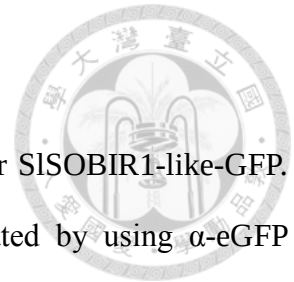
Figure 2. Immunoblot analysis of proteins coimmunoprecipitated with SISOBIR1-GFP and SISOBIR1-like-GFP.

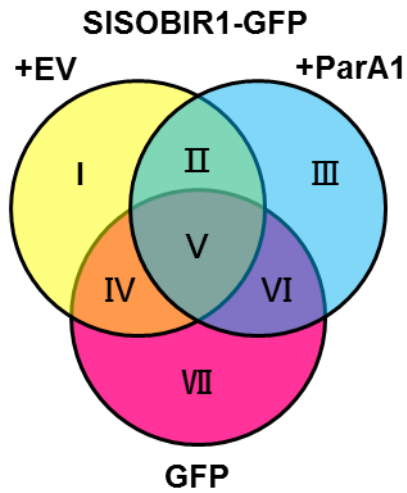
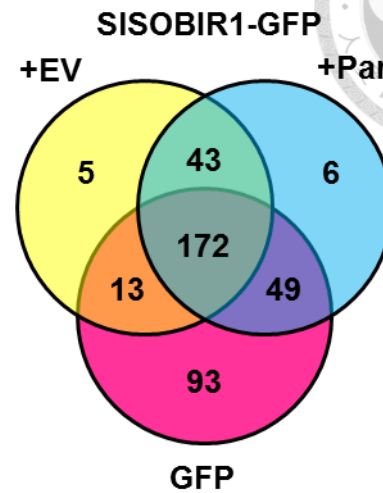
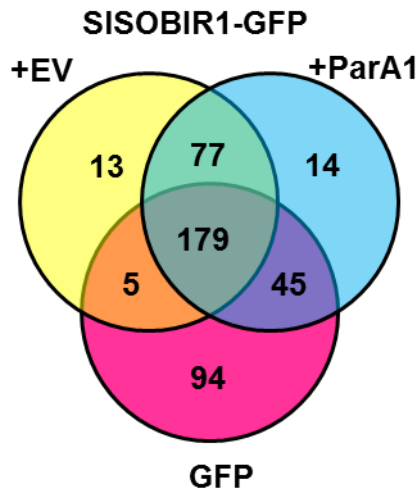
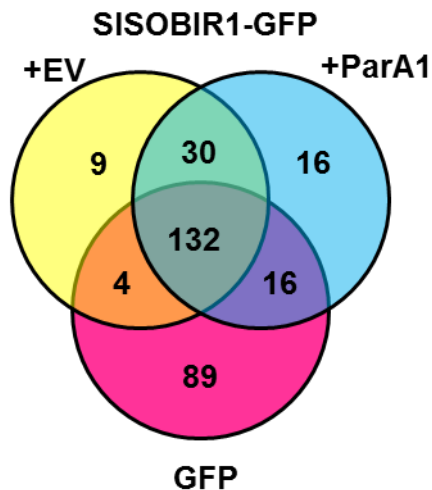
A. Immunoblot analysis of *Nicotiana benthamiana* total proteins. At 22 h post-agroinfiltration for coexpression of ParA1 [or the empty vector (EV) as a control] with SISOBIR1-GFP, SISOBIR1-like-GFP, or GFP on 4-week-old *N. benthamiana* leaves, total proteins were isolated and analyzed by 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by immunoblot analysis using α -GFP antibody. The arrow indicates positions of

GFP-fusion proteins. CBR: staining with coomassie brilliant blue.

B. Analysis of proteins coimmunoprecipitated with SISOBIR1-GFP or SISOBIR1-like-GFP.

Total proteins was prepared as shown in (A) and immunoprecipitated by using α -eGFP antibody. The precipitates were then analyzed by 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (upper panel), followed by immunoblot analysis using α -eGFP antibody (lower panel). Arrows indicate positions of GFP-fusion proteins.

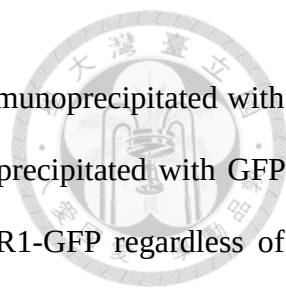


A**B****C****D**

圖三、以 Venn diagrams 呈現各處理情況下之 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白的數量

Figure 3. Venn diagrams to show the number of proteins coimmunoprecipitated with SISOBIR1-GFP.

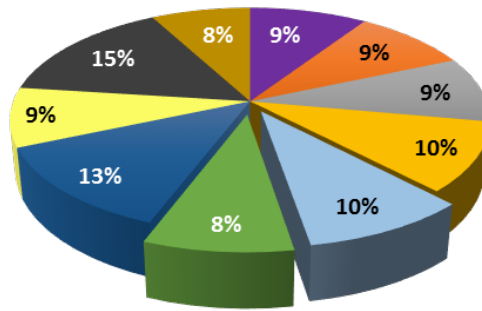
A. A Venn diagram for demonstrating the representation of each category of proteins. Cyan circle: proteins coimmunoprecipitated with SISOBIR1-GFP in the presence of ParA1; Yellow circle: proteins coimmunoprecipitated with SISOBIR1-GFP in the absence of ParA1; magenta circle: proteins coimmunoprecipitated with GFP with or without ParA1 treatment.



The area marked with Roman numeral I: the number of proteins coimmunoprecipitated with SISOBIR1-GFP in the absence of ParA1, exclusive of those immunoprecipitated with GFP (IV); II: the number of proteins coimmunoprecipitated with SISOBIR1-GFP regardless of ParA1 treatment, exclusive those coimmunoprecipitated with GFP (V); III: the number of proteins coimmunoprecipitated with SISOBIR1-GFP in the presence of ParA1, exclusive of those coimmunoprecipitated with GFP VI. VII: the number of proteins coimmunoprecipitated only with GFP with or without ParA1 treatment. **B**, **C**, and **D**: Venn diagrams to show the number of proteins for each category from 3 independent biological repeats, respectively, as demonstrated in (A).

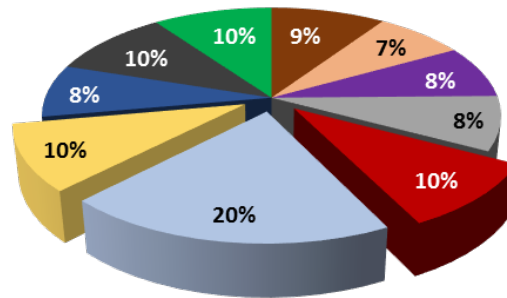


A



■ nucleobase-containing compound metabolic process ■ carbohydrate metabolic process
 ■ cellular metabolic process ■ protein metabolic process
 ■ response to stress ■ response to abiotic stimulus
 ■ catabolic process ■ single-organism cellular process
 ■ biosynthetic process ■ cellular component organization

B



■ regulation of biological process ■ organic substance metabolic process
 ■ nucleobase-containing compound metabolic process ■ cellular metabolic process
 ■ response to biotic stimulus ■ response to stress
 ■ response to endogenous stimulus ■ catabolic process
 ■ biosynthetic process ■ signal transduction

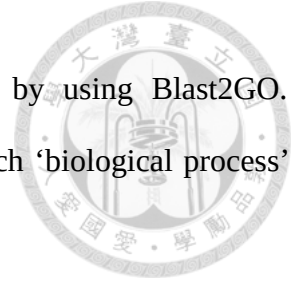
圖 四、 SISOIR1 免疫共沉澱蛋白之 GO term 分析

Figure 4. GO term analysis of SISOIR1-coimmunoprecipitated proteins.

A. Top ten GO terms of 'biological process' for 132 proteins which coimmunoprecipitated with SISOIR1 in the absence of ParA1.

B. Top ten GO terms of 'biological process' for 25 proteins specifically coimmunoprecipitated with SISOIR1 in the presence of ParA1. The GO terms were filtered

by their Blast2GO Node-Score, and the statistics was performed by using Blast2GO. Percentages indicate the ratio of protein sequences associated with each 'biological process' GO term. *P<0.05.



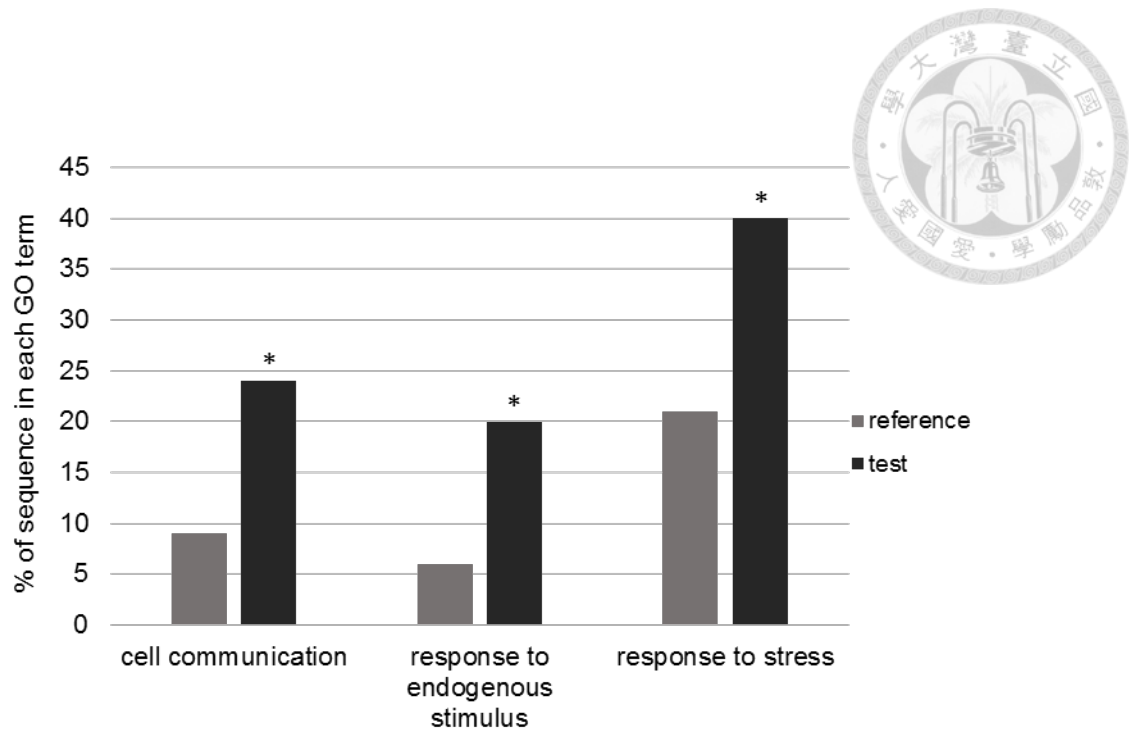
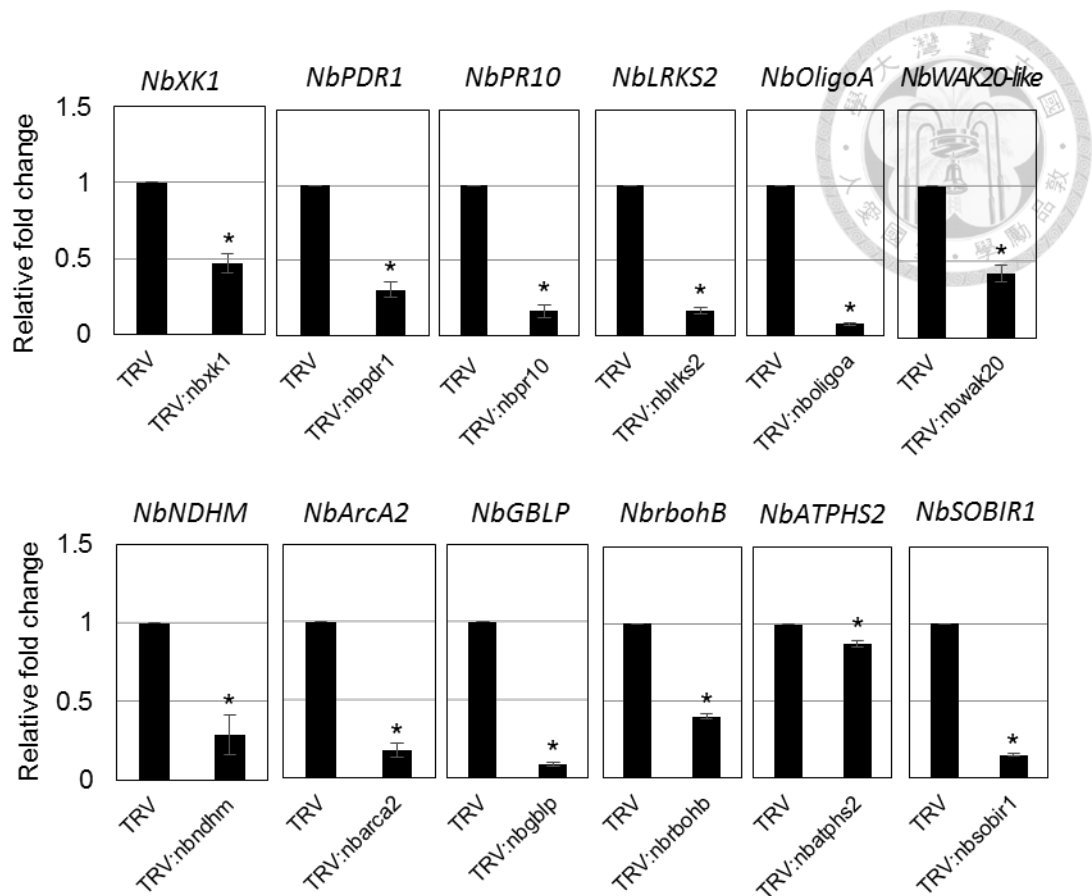


圖 五、 ParA1 處理時 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白之 GO term enrichment 分析

Figure 5. GO term enrichment analysis of proteins coimmunoprecipitated with SISOBIR1 in response to ParA1 treatment.

Test: proteins that were copurified with SISOBIR1 in response to parA1 treatment; reference: all SISOBIR1 copurified proteins. Statistical analysis was performed by Fisher's exact test using a one-tailed P-value (* $P < 0.05$).

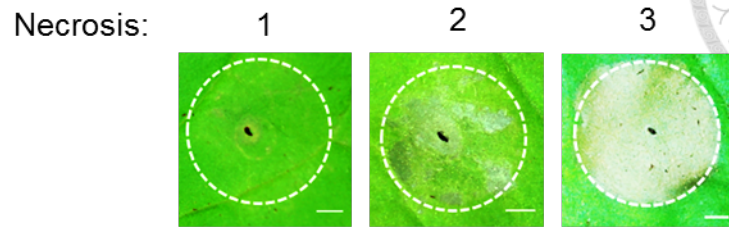


圖六、以 TRV-mediated gene silencing 技術靜默各供試基因之表現

Figure 6. Genes encoding SISOBIR1-associated proteins of interest are down regulated after TRV-mediated gene silencing.

At 21 days after agroinfection of 2 week-old *Nicotiana benthamiana* for TRV-mediated gene silencing, total RNAs were isolated and quantified by qRT-PCR. Raw data from three independent experiments for each gene were normalized to *NbEF-1 α* , and presented as mean $\pm$ SD fold change relative to the transcript obtained with plants infected with the empty vector TRV. * $P < 0.05$ by Student t test.

A



B

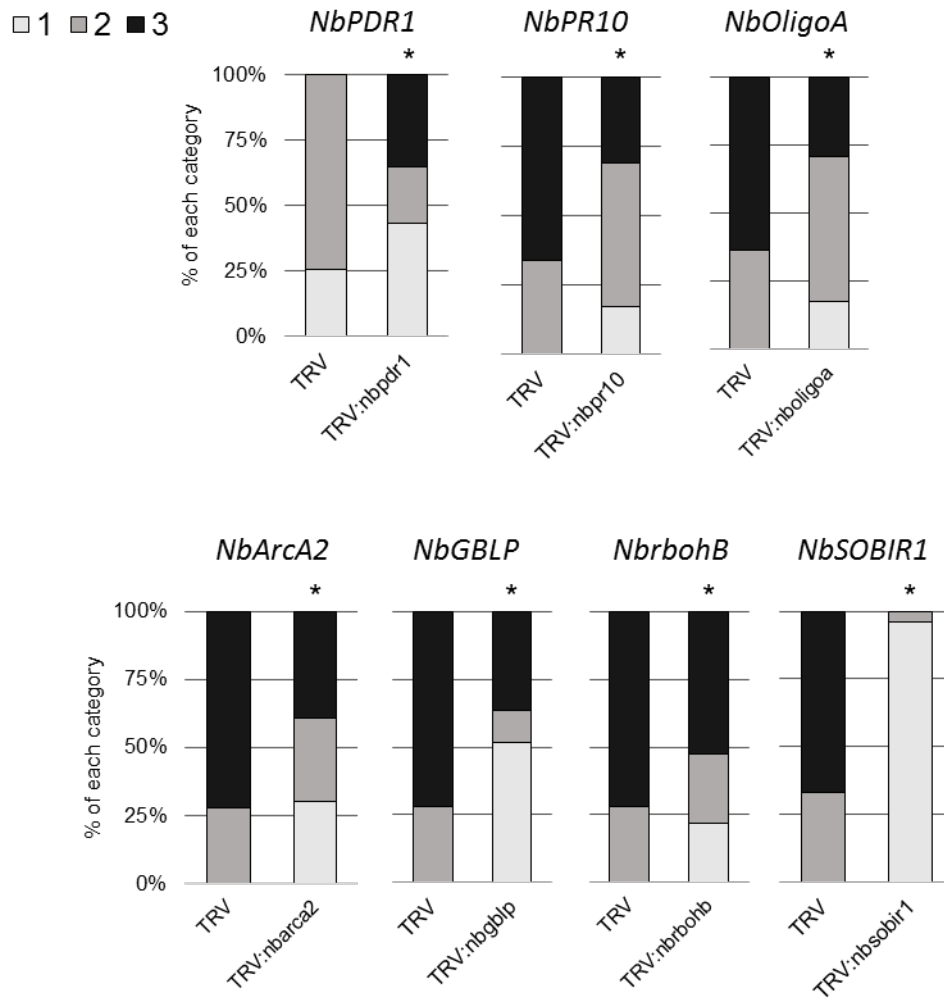


圖 七、靜默 *NbPDR1*, *NbPR10*, *NbOligoA*, *NbGBLP* 或 *NbrbohB* 之基因表現減少 ParA1 所誘導之細胞壞死情形

Figure 7. Silencing of *NbPDR1*, *NbPR10*, *NbOligoA*, *NbArcA2*, *NbGBLP* or *NbrbohB* compromised ParA1-induced necrosis.

A. ParA1-induced necrosis index on *Nicotiana benthamiana* leaves. At 21 days post-agroinfection for TRV-mediated gene silencing, ParA1 was expressed in the systemic leaves of *N. benthamiana* by agroinfiltration and leaves were examined for the development of necrosis at 42 h-post agroinfiltration. Severity of ParA1-induced necrosis were classified into three levels. '1', necrosis appeared on <20% of the infiltrated area; '2', necrosis appeared on 20-80% of the infiltrated area; '3', necrosis appeared on >80% of the infiltrated area. Bar = 2 mm.

B. ParA1-induced necrosis is compromised in *N. benthamiana* leaves silenced for the expression of *NbPDR1*, *NbPR10*, *NbOligoA*, *NbArcA2*, *NbGBLP* and *NbrbohB*. For each gene, 18 leaves from six silenced plants were agroinfiltrated on 4 spots. At 42 h-post agroinfiltration, ParA1-induced necrosis of each spot were scored as shown in (A). Statistics were performed by Wilcoxon rank-sum test, which compared necrosis severity on each silenced plant with the control plant with the empty vector (TRV). Three independent experiments were performed with similar results and calculated in one. *P<0.001 by Wilcoxon rank-sum test.



附錄

附表 一、 帶有 leucine-rich repeat domain 之 SISOBIR1 免疫共沉澱蛋白 ^a

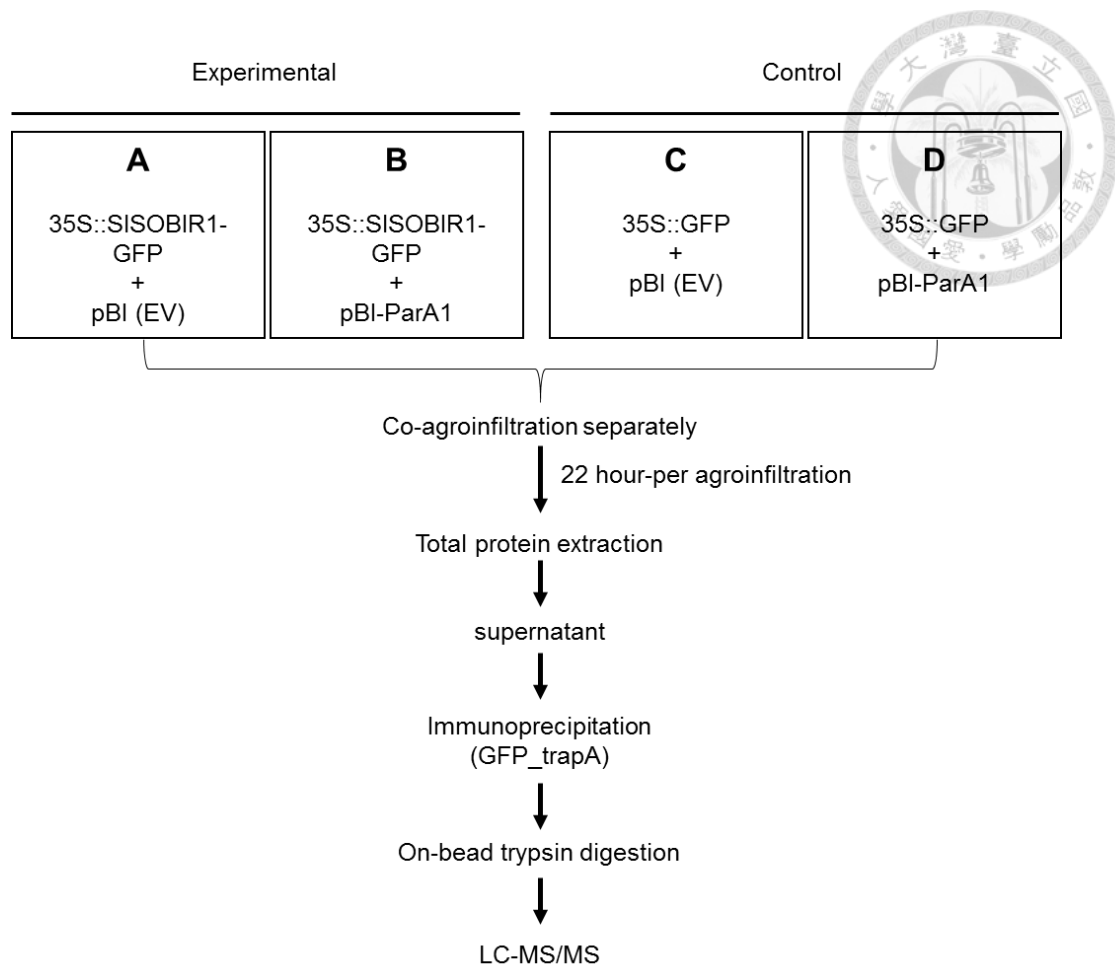
Table S 1. SISOBIR1-immunoprecipitated proteins predicted to contain leucine-rich repeats^a

SGN ^b accession number	Protein description ^c
NbS00026313g0011.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Ve1 homolog)
NbS00001134g0002.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Eix1 homolog)
NbS00024693g0004.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Eix2 homolog)
NbS00024487g0013.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Eix2 homolog)
NbS00007007g0003.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP (Ve2 homolog)
NbS00003586g0006.1	probable leucine-rich repeat receptor-like protein at1g35710-like
NbS00052782g0001.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP
NbS00039543g0002.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP
NbS00021769g0027.1	LRR receptor serine/threonine protein RLP
NbS00033946g0003.1	Receptor kinase
NbS00033954g0001.1	leucine-rich repeat receptor-like serine threonine tyrosine-protein kinase sobir1-like
NbS00037616g0014.1	leucine-rich repeat receptor-like serine threonine tyrosine-protein kinase sobir1-like

a. Proteins predicted to contain LRRs based on InterProScan.

b. SGN: Sol Genetic Network.

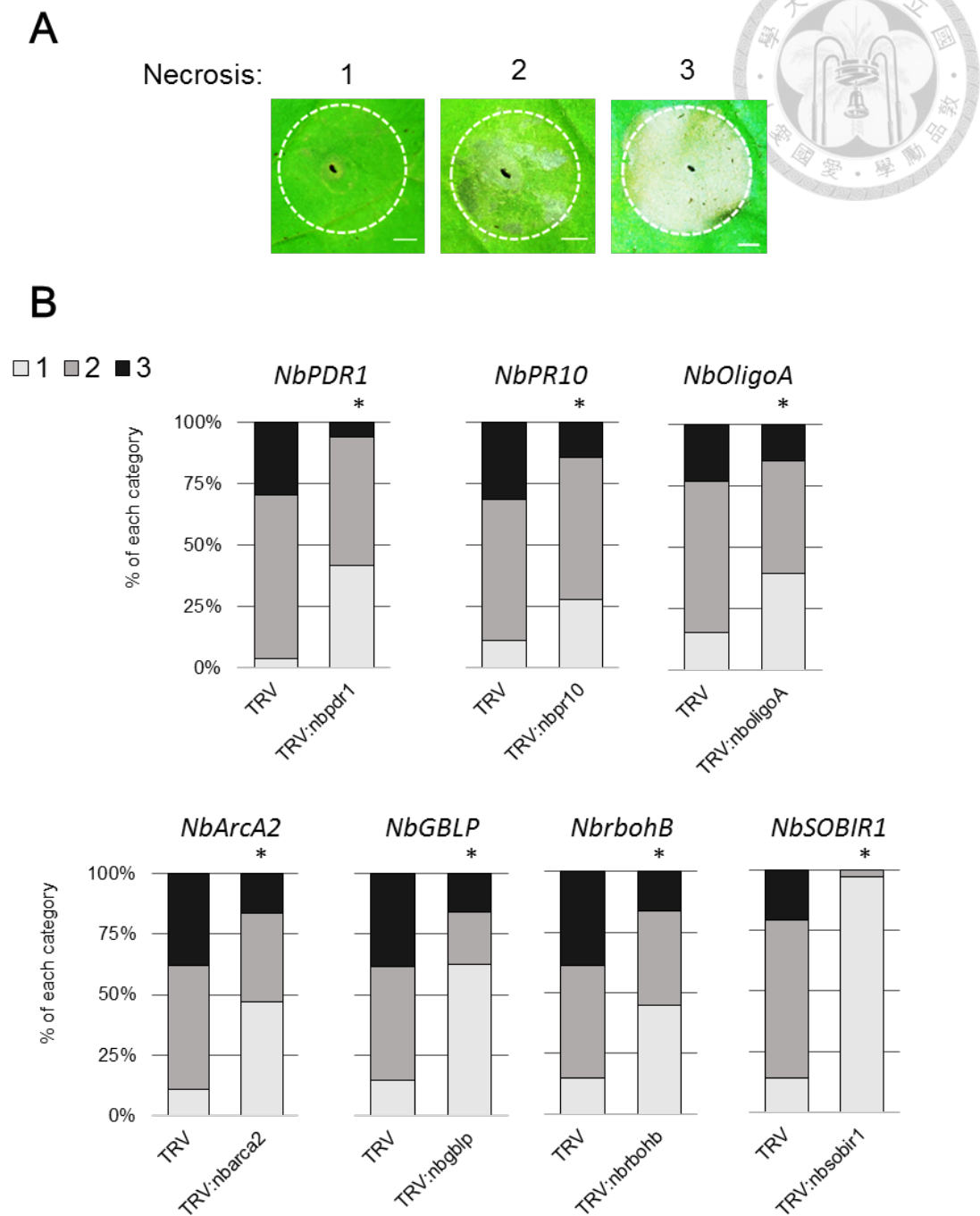
c. Protein description in SGN for each accession.



附圖 一、 質譜儀分析重組蛋白 SISOBIR1-GFP 蛋白複合體之實驗流程圖

Figure S 1. Flow chart of MS-based proteomic analysis of GFP-tag affinity purified SISOBIR1 protein complex.

Experimental and control groups are designed as shown. Soluble (supernatant) proteins were purified by GFP_trapA, and subjected to LC-MS/MS.



附圖 二、 靜默 *NbPDR1*, *NbPR10*, *NbOligoA*, *NbGBLP* 或 *NbRbohB* 之基因表現減少 ParA1 所誘導之細胞壞死情形

Figure S 2. Silencing of *NbPDR1*, *NbPR10*, *NbOligoA*, *NbArcA2*, *NbGBLP* or *NbrbohB* compromised ParA1-induced necrosis.

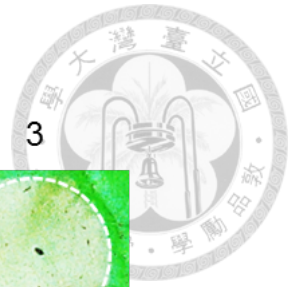
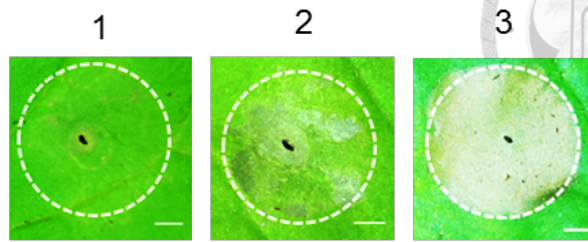
A. ParA1-induced necrosis index on *Nicotiana benthamiana* leaves. At 21 days

post-agroinfection for TRV-mediated gene silencing, ParA1 was expressed in the systemic leaves of *N. benthamiana* by agroinfiltration and leaves were examined for the development of necrosis at 42 h-post agroinfiltration. Severity of ParA1-induced necrosis were classified into three levels. '1', necrosis appeared on <20% of the infiltrated area; '2', necrosis appeared on 20-80% of the infiltrated area; '3', necrosis appeared on >80% of the infiltrated area. Bar = 2 mm.

B. ParA1-induced necrosis is compromised in *N. benthamiana* leaves silenced for the expression of NbPDR1, NbPR10, NbOligoA, NbArcA2, NbGBLP and NbrbohB. For each gene, 18 leaves from six silenced plants were agroinfiltrated on 4 spots. At 36 h-post agroinfiltration, ParA1-induced necrosis of each spot were scored as shown in (A). Statistics were performed by Wilcoxon rank-sum test, which compared necrosis severity on each silenced plant with the control plant with the empty vector (TRV). Three independent experiments were performed with similar results and calculated in one. * $P < 0.001$ by Wilcoxon rank-sum test.

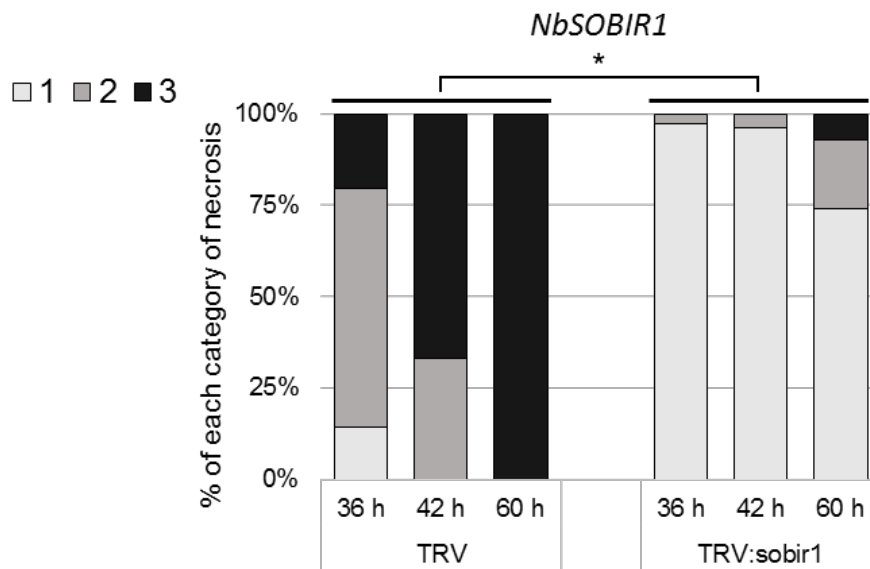
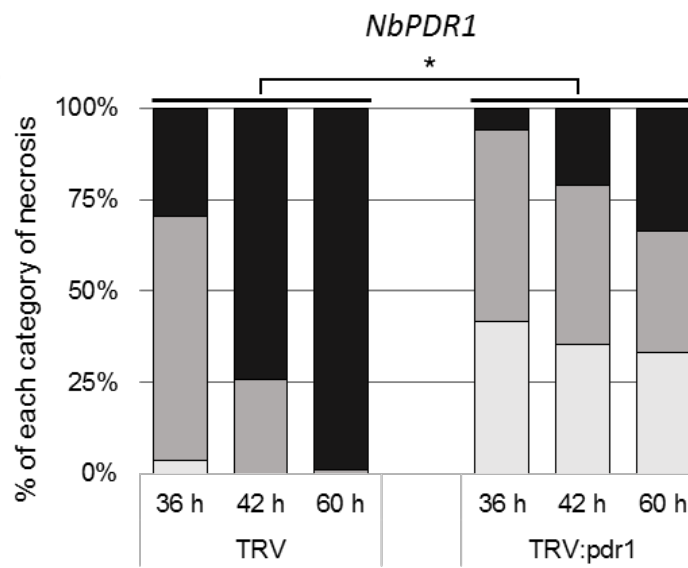
A

Necrosis:



B

□ 1 □ 2 ■ 3



附圖 三、 靜默 *NbPDR1* 之基因表現緩降 ParA1 誘導之細胞壞死發展

Figure S 3. Silencing of *NbPDR1* compromise development of ParA1-induced necrosis.

A. ParA1-induced necrosis index on *Nicotiana benthamiana* leaves. At 21 days post-agroinfection for TRV-mediated gene silencing, ParA1 was expressed in the systemic leaves of *N. benthamiana* by agroinfiltration and leaves were examined for the development of necrosis at 42 h-post agroinfiltration. Severity of ParA1-induced necrosis were classified into three levels. '1', necrosis appeared on <20% of the infiltrated area; '2', necrosis appeared on 20-80% of the infiltrated area; '3', necrosis appeared on >80% of the infiltrated area. Bar = 2 mm.

B. ParA1-induced necrosis is compromised in *N. benthamiana* leaves silenced for the expression of *NbPDR1*, *NbPR10*, *NbOligoA*, *NbArcA2*, *NbGBLP* and *NbrbohB*. For each gene, 18 leaves from six silenced plants were agroinfiltrated on 4 spots. At 36, 42, 60 h-post agroinfiltration, ParA1-induced necrosis of each spot were scored as shown in (A). Statistics were performed by Wilcoxon rank-sum test, which compared necrosis severity on each silenced plant with the control plant with the empty vector (TRV). Three independent experiments were performed with similar results and calculated in one. * $P < 0.001$ by Wilcoxon rank-sum test.