

國立臺灣大學生命科學院植物科學研究所



碩士論文

Institute of Plant Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

效應蛋白 RSp0213 與 PopP3 在青枯病菌致病力
之功能研究

Roles of Effectors RSp0213 and PopP3 in Virulence of
Ralstonia solanacearum

鞠泰翔

Tai-Hsiang Chu

指導教授：鄭秋萍 博士

Advisor: Dr. Chiu-Ping Cheng

中華民國一百零三年七月

July, 2014

國立台灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

效應蛋白 RSp0213 與 PopP3 在青枯病菌致病力之功能研究

Roles of Effectors RSp0213 and PopP3 in Virulence of
Ralstonia solanacearum

本論文係鞠泰翔君 (R01B42034) 在國立台灣大學植物科學研究所
完成之碩士論文，於民國一百零三年七月二十五日承下列考試委員審
查通過及口試及格，特此證明

口試委員： 台灣大學植物科學研究所

鄭秋萍 副教授 (指導教授)

鄭秋萍

台灣大學植物病理與微生物學系

劉瑞芬 教授

劉瑞芬

中央研究院植物暨微生物學研究所

賴爾珉 副研究員

賴爾珉

台灣大學農業化學系

林乃君 副教授

林乃君

台灣大學生物科技研究所

劉啟德 助理教授

劉啟德

謝誌



非常感謝秋萍老師的協助，讓我有機會參與以及完成研究歷程的學習，並給予我極大的信任、支持與包容，謝謝您！也要感謝口試委員劉瑞芬老師、賴爾珉老師、林乃君老師、劉啟德老師，百忙中願意撥空修改我的論文，您們的建議令我獲益良多，也給了這個研究主題相當實際且清楚的發展方向。

感謝玉梅、安琪、怡君，感念你們一直以來對實驗室的付出。感謝巧燕，在我初踏入實驗室惶惶不安時，妳總是毫無學姐架子地給予真誠關心，一定要幸福喔！感謝詠竹、盈茹、張芯，謝謝你們實驗上的細心傳承。感謝益敏，當我的實驗結果尚未被認可時，你是第一個給予我鼓勵的人，並且教了我很多該有的實驗態度及規劃的概念，真的是很好的師傅！感謝紅葳、林露，希望妳們在完成碩士試煉後能早日找到傳說中的好男人。感謝友慧、黃琪，無論如何都要謝謝妳們這兩年來非常多事情上的幫忙與 cover，儘管大家常常會被低壓籠罩，但我心裡清楚，是妳們一路上的幫忙讓我能不孤單地走到今天。感謝峰繼和澤延，因為有你們的加入，讓實驗室開始出現不一樣的氛圍，你們是我碩二時光裡很重要的回憶，也是難得遇到臭味相投的朋友。感謝雅婷，妳沒開口前絕對是個氣質正妹，謝謝妳兩年來時不時的八卦與星巴克好友分享。感謝典倫、忠岳、彭正，和你們一起吃飯、聊天、亂講話的時光絕對是研究所生活相當重要的部分，謝謝你們一路的陪伴。感謝翊郢、紫煥、朝偉、慧珊、家綺，謝謝各位九樓好夥伴們在實驗崩潰之餘仍不忘各種相約拍照。感謝健生(大便)、章靖(草履蟲)、備巡(胖子)、博恩(Julie 茉莉)、憶敏，會特別打綽號絕對是因為有些人綽號比名字好記，謝謝你們在我口試時的各種幫忙，這屆剛好許多帶有異常怨念的老人都離開了，真心希望你們能建立起屬於你們自己的實驗室氣氛，好好加油喔！

兩年的時光飛逝，許多的歡笑與淚水，伴隨著眾多的壓力與挫折，讓我深刻地學習到了處世的態度和成長。埋首研究的日子裡，春夏交替、乍暖還寒，一路上走過的、看到的、學到的，真的太多太多，遠超過自己當初的想像，這份經歷絕對是讓人體會深刻。願大家四散東西後，能以有限的生命釋放無限的光芒，願一切順利、一切平安。

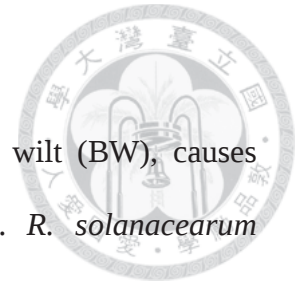
泰翔於 2014・台北・夏

中文摘要

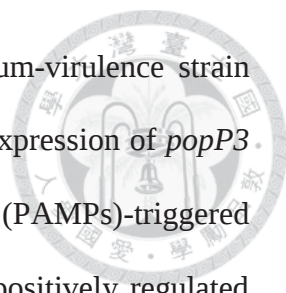
青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引發全球許多作物之致死萎凋病害，常造成全球作物巨大經濟損失。隸屬於 phylotype I 的青枯病菌菌株可根據在抗感病品系番茄上引起的致死率，進一步定義其毒力高低，但目前關於決定青枯病菌致病力之分子機制所知極少。為瞭解青枯病菌之致病力因子，我們已完整定序四個不同毒力的青枯病菌株，發現效應蛋白 (effector) RSp0213 只存在中毒力菌株 (如 Pss4) 與低毒力菌株 (如 Pss216) 中，而高毒力菌株 (如 Pss190) 則無此 effector。本研究之研究目標為探討 RSp0213 在青枯病菌致病力及與寄主交互作用中之角色。結果發現在具有 RSp0213 的中毒力菌株 Pss4 中將 RSp0213 剔除會提高 Pss4 在番茄之致病力，而在無 RSp0213 的高毒力菌株 Pss190 中大量表現此 effector 基因則可降低 Pss190 在番茄之致病力，故 RSp0213 確實是決定青枯病菌致病力之關鍵因子。此外，在菸草葉片中表現 RSp0213 會造成細胞死亡的現象；在番茄中過量表現 RSp0213 亦導致細胞死亡與植株矮化，且會誘導水楊酸、乙烯及過敏性反應訊息傳導相關基因之表現，進而增強番茄對高毒力青枯病菌菌株 Pss190 之抗性。另外，序列分析預測與 GFP 融合蛋白檢測確認 RSp0213 座落在菸草細胞膜上，且此座落特性為執行其功能之必要條件。以上結果顯示，RSp0213 可能被番茄細胞辨認並進而誘發防禦機制，導致含有此效應蛋白之青枯病菌菌株的致病力降低，而高毒力菌株則因無 RSp0213 而較不會誘發寄主之強烈抗病機制。論文第二部分由於源自蕃茄的 Pss190 菌株具有極高毒力，根據其基因體序列顯示 Pss190 特有效應蛋白 *Pseudomonas* outer protein P 3 (PopP3)，故本研究旨在探討 PopP3 在青枯病菌致病力之功能與其相關機制。本研究室的先前研究證實此 T3E 會受 T3SS 調控，研究結果亦顯示基因轉移表現至中毒力菌株 Pss4 可增強其在番茄上的致病力，而將 PopP3 表現於菸草葉片無病徵產生但有利於青枯病菌之生長，並推測其在植物粒線體的座落位置與其功能有關，可能藉此影響番茄 PTI 指標之一的癒傷葡聚糖累積 (callose deposition)，以抑制植物 PTI 反應。本研究旨在進一步證實 PopP3 粒線體座落位置對其功能之重要性，並檢測此 T3E 在基因轉移表現下，青枯病菌在番茄上的致病力表現，和其功能與 HR 之相關性，以闡明 PopP3 如何抑制植物的相關防禦反應機制。

關鍵字：青枯病菌、效應蛋白、RSp0213、PopP3、致病力、effector-triggered immunity, effector-triggered susceptibility

Abstract



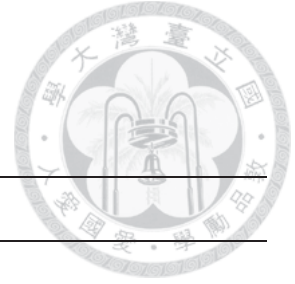
Ralstonia solanacearum, the causal bacterium of bacteria wilt (BW), causes severe production losses on many important crops worldwide. *R. solanacearum* phylotype I strains confer varied degrees of virulence/aggressiveness on tomato plants; however, genetic information on pathogen virulence-related factors is still very limited. To uncover virulence-related factors, genomes of four *R. solanacearum* phylotype I strains with different virulence were sequenced. A putative effector protein RSp0213 is present in medium-virulence and low-virulence strain such as Pss4 and Pss216, but absent in high-virulence strain such as Pss190. This study aimed to elucidate roles of RSp0213 in *R. solanacearum* virulence and plant-bacterium interaction. Disruption of *RSp0213* in medium-virulence strain Pss4 resulted in increased bacterial virulence in tomato, while *RSp0213* overexpression in high-virulence strain Pss190 leads to decreased bacterial virulence, evidencing a decisive role of RSp0213 in *R. solanacearum* virulence. Additionally, transient local overexpression of *RSp0213* in *Nicotiana benthamiana* leaves led to cell death. Virus-mediated overexpression of *RSp0213* in tomato also caused cell death, reduced plant growth, increased expression of marker genes involved in defense hormones and hypersensitive-response signaling pathways, and enhanced resistance to the high-virulence strain Pss190. Furthermore, GFP-tagged RSp0213 colocalizes with cell membrane of *N. benthamiana* and membrane localization is required for its functions. These results suggest that RSp0213 can be recognized by host cell, leading to induced defense response and thus reduced virulence of RSp0213-containing *R. solanacearum* strains. The absence of this effector enables high-virulence strains escape from host recognition, leading to the high virulence. The second part of this thesis aimed to uncover a YopJ-type effector protein Pseudomonas outer protein P 3 (PopP3) unique to a high-virulence strain Pss190. Our



previous study showed that overexpression of *popP3* in *Rs* medium-virulence strain Pss4 led to increased bacterial virulence in tomato. Transient overexpression of *popP3* in tomato suppresses pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)-triggered immunity (PTI) related callose deposition. *popP3* transcripts was positively regulated by the type III secretion system (T3SS) regulator HrpG. Furthermore, This study proved the mitochondria localization of PopP3 in plant cell is critical to it function on tomato. These results together suggest that PopP3 is a T3SS effector and contributes to the virulence of *R. solanacearum* by suppressing plant defense response which related to mitochondrial functions.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, effector, RSp0213, PopP3, virulence, effector-triggered immunity, effector-triggered susceptibility

常用縮寫與全名對照表



縮寫	全名
a.a.	Amino acid
BSA	Bovine serum albumin
bp	Base pair
CFU	Colony formation unit
DEPC	Diethypyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DPI	Days post inoculation
EtBr	Ethidium bromide
EtOH	Ethanol
GFP	Green fluorescence protein
GUS	β -glucuronidase reporter gene
H7996	Hawaii 7996
HR	Hypersensitive response
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
<i>Pcc</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PVX	Potato virus X
ROS	Reactive oxygen species
sqRT-PCR	Semi-quantitative reverse transcription PCR
rpm	Rotation per minutes
<i>Rs</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SM1	Semi-selective medium
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside

目錄



口試委員審定書	I
謝誌	II
中文摘要	III
英文摘要	IV
常用縮寫與全名對照表	VI
目錄	VII

第一章 前言	1
1. 第三型蛋白分泌系統	1
1.1 調控蛋白	1
1.2 構造蛋白	2
1.3 效應蛋白	2
2. 青枯病與青枯病菌	3
3. 青枯病菌的分子致病機制	4
4. 青枯病菌第三型分泌蛋白 T3Es	4
4.1 Harpin	6
4.2 GALA 家族	6
4.3 AvrA	7
4.4 YopJ superfamily	7
5. 植物病害防禦反應	8
5.1 植物 PTI 防禦反應	8
5.2 植物 ETI 防禦反應	9
5.3 植物細胞膜構造蛋白參與防禦反應	9
6. 病原細菌效應蛋白對植物之作用	10
6.1 作用於細胞膜之效應蛋白	10
6.2 作用於粒線體之效應蛋白	11
6.3 作用於葉綠體之效應蛋白	11

6.4 作用於囊泡運輸之效應蛋白	12
6.5 作用於 MAPK 訊息傳遞之效應蛋白	12
6.6 作用於細胞核之效應蛋白	12
6.7 攻擊轉譯之效應蛋白	13
7. 前人研究與研究動機	13
第二章 材料與方法	15
1. 供試菌株、質體及菌株培養條件	15
2. 供試植物培育條件	15
3. 生物統計分析	15
4. 重組質體構築與 <i>popP3</i> 過量表現菌株建構	15
4.1. DNA 瓊脂糖凝膠電泳	15
4.1.1. 外染瓊脂糖凝膠電泳分析	15
4.1.2. 內染瓊脂糖凝膠電泳純化	16
4.2. 聚合酶連鎖反應	16
4.2.1. Taq PCR (Violet)	16
4.2.2. Q5® Taq PCR (Invitrogen)	16
4.3. 質體萃取	17
4.3.1. 大腸桿菌質體萃取	17
4.3.2. 青枯病菌與農桿菌質體萃取	17
4.4. DNA 純化	18
4.5. DNA 限制酶消化水解	18
4.6. DNA 片段接合	18
4.7. TOPO® 質體構築	18
4.8. LR 重組互換反應	19
4.9. 大腸桿菌勝任細胞熱休克轉型作用	19
4.10. 電穿孔轉型作用之勝任細胞置備	19
4.10.1. 青枯病菌、農桿菌	20
4.10.2. 大腸桿菌	20
4.11. 電穿孔轉型作用	20

4.12. 青枯病菌染色體 DNA 萃取	21
5. 青枯病菌效應蛋白功能研究	21
5.1. 菸草原生質體萃取與蛋白座落位置檢測	21
5.2. 效應蛋白於菸草葉片細胞座落位置檢測	22
5.3. 青枯病菌致病力測試	22
6. 植物體短暫表現效應蛋白 與其功能性研究	23
6.1. 菸草葉部基因短暫表現	23
6.2. 番茄短暫性病毒誘導基因過量表現	23
6.3. 植物體短暫表現基因檢測	24
6.3.1 植物 RNA 萃取	24
6.3.2 反轉錄聚合酶連鎖反應	24
6.3.3. 半定量 RT-PCR	24
6.3.4. 即時定量 Real-time PCR	25
第三章 結果	27
I. 低/中毒力菌株特有之 RSp0213 與 RSc3174 在青枯病菌致病力之功能研究	27
1. RSp0213 與 RSc3174 在已完全解序之青枯病菌菌株中之分佈	27
2. RSp0213 和 RSc3174 對青枯病菌致病力之影響	27
3. RSp0213 蛋白在植物細胞中之座落位置	28
4. RSp0213 過量表現對植物之影響	28
5. 在番茄表現 RSp0213 對病害反應之影響	29
6. 在番茄表現 RSp0213 對防禦反應相關標誌基因表現之影響	29
7. 決定 RSp0213 蛋白在植物細胞中之座落位置的重要區段分析	29
8. RSp0213 座落於植物細胞膜對其功能之重要性	29
II. 高毒力菌株特有之效應蛋白 PopP3 在青枯病菌致病力之功能研究	30
1. PopP 家族成員在青枯病菌菌株之分佈與序列相似性	30
2. 在高毒力菌株 PopP3 之分佈	31
3. PopP2 對青枯病菌在番茄上致病力之影響	31
4. PopP3 對病菌誘導之菸草過敏性反應的抑制能力	31

5. 在番茄表現 <i>popP3</i> 對病害反應之影響	32
6. 決定 PopP3 蛋白在植物細胞中之座落位置的重要區段分析	32
7. 片段刪除後之 PopP3 對青枯病菌致病力及對番茄病害反應之影響	33
 第四章 討論	34
一、青枯病菌 RSp0213 之功能研究	34
1. RSp0213 降低青枯病菌對番茄之致病力	34
2. 在植物表現 RSp0213 會誘導防禦反應	35
3. RSp0213 座落於植物細胞膜對其功能至關重要	36
4. RSp0213 誘導植物 ETI 反應的可能機制與未來展望	37
二、青枯病菌 PopP3 之功能研究	37
1. 高毒力菌株 Pss190 特有之 PopP3 為青枯病菌重要的致病力因子	37
2. PopP3 會抑制植物 PTI 反應	38
3. PopP3 座落於植物粒線體對其功能至關重要	39
4. PopP3 抑制植物 PTI 反應的可能機制與未來展望	40
 參考文獻	42
表	50
圖	52
附表	75
附圖	90

第一章 前言



1. 第三型蛋白分泌系統

第三型蛋白分泌系統 (type III secretion system, T3SS) 廣泛存在於革蘭氏陰性菌，如動物病原菌 *Yersinia* spp.、*Pseudomonas aeruginosa* 以及植物病原菌 *Pseudomonas syringe*、*Xanthomonas* spp.、*Pectobacterium* spp. 等 (Troisfontaines and Cornelis, 2005)。當病原菌接觸到寄主時，即會大幅地活化第三型蛋白分泌系統，透過此系統可將效應蛋白 (effector) 直接送入真核細胞中，藉以影響寄主細胞的正常生理活動，進而改變病原菌的感染結果 (Deslandes and Rivas, 2012)。

而關於 T3SS 參與病害反應機制的時間點，近期研究指出第三型蛋白分泌系統在感染初期與後期都會持續表現，顯示第三型分泌系統在致病過程中應皆有關鍵功能 (Poueymiro and Genin, 2009; Monteiro et al., 2012; Stotz et al., 2014)。植物病原菌的第三型蛋白分泌系統係由 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity)/*hrc* (hypersensitive response and conserved) 基因組所轉錄，這些基因組參與細菌在感病品系植物上的致病力、以及抗病品系植物上的過敏性反應 (hypersensitive response, HR) (Tang et al., 2006)。病原菌感染植物時所產生之第三型分泌蛋白，依據寄主植物的辨識能力可導致兩種完全相反的結果：若第三型分泌蛋白受到植物的抗性蛋白 (resistant protein, R protein) 所辨認，則植物會啟動快速而激烈的免疫反應，包括產生 callose 將細胞壁增厚，並在被感染的細胞內大量累積過氧化物促使細胞凋亡 (programmed cell death, PCD)，將病原菌侷限在侵入位置，而此類受辨識的第三型分泌蛋白稱為 avirulence protein (Avr protein)；相反地，若第三型分泌蛋白不受到寄主植物辨認，則此類效應蛋白可能成功抑制寄主防禦反應，使病原菌成功感染植物而造成病徵，此類的第三型分泌蛋白則稱為 virulence protein (Deslandes and Genin, 2014; Kazan and Lyons, 2014)。病原菌的第三型分泌蛋白系統之相關基因依照其功能特性，可區分成三種蛋白：控制第三型分泌系統表現之調控蛋白、將特定蛋白送入寄主體內的構造蛋白及被分泌至病原菌細胞外的效應蛋白，詳細敘述如下：

1.1 調控蛋白

植物病原菌根據 *hrp* 操縱組 (operon) 的結構以及調控方式，可將第三型分泌蛋白的調控系統區分成兩大類：第一類為 *P. syringe*、*Pectobacterium* spp. 和 *Pantoea stewartii*，此類植物病原菌 *hrp* 操縱組受到隸屬 ECF family 的轉錄因子 HrpL 所調控，HrpS 與 HrpR 交互作用後與 sigma δ^{54} 結合並活化 HrpL，一旦 HrpL 受到活化便會啟動下游基因的表現；第二類則為 *R. solanacearum* 和 *Xanthomonas* spp.，此類植物病原菌的 *hrp* 操縱組可由 AraC-like 的活化子 (activator) 所活化，在 *Xanthomonas* spp. 中稱為 HrpX，在 *R. solanacearum* 中稱為 HrpB，兩者皆會辨識啟動子帶有特定序列的基因啟動表現，會受 HrpG 活化後再活化下游 *hrp* 基因之轉錄 (Tang et al., 2006) (附圖一)。

1.2 構造蛋白

病原菌將效應蛋白送入植物細胞的過程，需要通過物理屏障：兩層細菌自身的細胞膜、一層肽聚糖 (peptidylglycan) 細胞壁，以及植物的細胞膜和纖維素 (cellulose) 細胞壁。因此病原菌發展出一種長針管狀的構造稱為 Hrp pilus，負責連接細菌與植物細胞，以利將效應蛋白傳送至寄主細胞中 (Büttner and He, 2009)。研究發現雖然不同亞種 (subspecies) 間 Hrp pili 的預測二級結構十分相似，但組成的胺基酸序列卻差異甚大 (Weber and Koebnik, 2005)，推測細菌必須藉由演化來不斷改變此直接與植物細胞接觸之管狀結構，以避免被植物辨識而誘發植物的防禦反應 (Büttner and He, 2009)。

1.3 效應蛋白

經第三型蛋白分泌系統所分泌、輸送之蛋白稱為效應蛋白 (effector)，其主要功能在於干擾植物細胞生理活動、影響植物細胞免疫反應，以改變病原菌致病能力。效應蛋白在植物細胞的作用位置上分為兩類：一類是會被送入植物細胞內的蛋白，例如 *hop* (hrp-dependent outer protein) 基因所編譯的蛋白 (Alfano et al., 2000)；另一類的效應蛋白作用於植物細胞間隙，不會進入細胞內，最早發現者有 *P. syringae* 的 HrpZ 及 *R. solanacearum* 的 PopA (Arlat et al., 1992)。在生物資訊分析上的研究顯示，無論植物或動物病原菌的效應蛋白，其 N 端 25 個胺基酸序列皆富含 Ser 與 coiled 的區域、並缺乏 Leu (Arnold et al., 2009; Samudrala et al., 2009)，推測這樣可彎曲的蛋白結構有助於效應蛋白通過狹窄的 Hrp pilus (Büttner

and He, 2009)；此外，效應蛋白在分泌過程中，多數的效應蛋白必須有特定的伴隨蛋白 (chaperone) 協助才能進行，第三型分泌蛋白系統的伴隨蛋白通常小於 170 個胺基酸、呈酸性、在 C 端具有雙極性 (amphipathic) 的 α -helix 結構 (Parsot et al., 2003)；有時伴隨蛋白還扮演維持效應蛋白穩定性的角色，如 *Pectobacteria amylovora* 的伴隨蛋白 DspF，就具有穩定該病菌關鍵效應蛋白 DspA/E 的功能 (Gaudriault et al., 2002)。

2. 青枯病與青枯病菌

青枯病，又稱細菌性萎凋病 (bacterial wilt, BW)，是由青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*, Rs) 所引起之土壤傳播性維管束病害。感染此病害的植株細根褐化腐爛、地上部下位葉首先下垂，而後葉片漸次萎凋，因萎凋快速故植株死亡時仍呈現青綠色，故稱為「青枯病」。此病原菌寄主範圍涵蓋約 50 科，超過 200 種植物，包括番茄、馬鈴薯及香蕉等重要經濟作物，目前尚無有效之化學防治方法，是世界上最嚴重的植物病害之一 (Poueymiro and Genin, 2009; Genin and Denny, 2012)。

青枯病菌為革蘭氏陰性 (Gram-negative)、好氧 (aerobic)、桿狀，屬 β -proteobacteria，生長的極限溫度為 4-40 °C，無法生長於含 2% 以上 NaCl 環境，在高營養培養基下易產生褐色素。青枯病菌可長年存活於土壤或水中，一般狀態下可殘存於土壤約 14 個月，最長可達 25 年，在 20-25 °C 純水中則可存活長達 40 年之久 (Denny, 2006)。青枯病菌的基因組共約 5.8 Mb，由一個環狀染色體 (3.7 Mb) 以及一個圈狀巨質體 (megaplasmid, 2.1 Mb) 所組成，其中存在許多 mobile element 及 mosaic structure，且基因組中含高比例 (66.5-68%) 的 GC 鹼基對。自 2002 年第一個由番茄分離而來之青枯病菌菌株 GMI1000 基因組被完整定序後 (Salanoubat et al., 2002)，目前共有 5 個菌株的基因組完整序列，以及 17 個菌株的序列初稿 (genome draft) 被定序完成 (Boucher, NCBI website; Genin and Denny, 2012; Remenant et al., 2012; Cao et al., 2013; 表一、表二)。

青枯病菌的菌系依照其不同特性可利用三種系統進行種內分群：根據寄主範圍可分成五種 races；依據對不同雙糖/糖醇之利用能力可分成六個 biovars；而以 DNA 序列分析演化關係可劃分成四個 phylotypes (Denny, 2006)。phylotypes 與菌株的地理來源大致吻合，分別為亞洲的 phylotype I，美洲的 phylotype II，非洲的

phylotype III，以及來自印尼、澳大利亞和日本的 phylotype IV (Fegan and Prior, 2006)。此外，與青枯病菌親緣相近的丁香樹病原菌 *Ralstonia syzygii* 與香蕉病原菌 blood disease bacterium (BDB) 也屬於 phylotype IV (Remenant et al., 2011)。基於上述的複雜性，目前普遍以 *R. solanacearum* species complex 來稱呼此群菌種 (Genin and Denny, 2012)。

3. 青枯病菌的分子致病機制

青枯病菌感染寄主植物過程十分複雜，在環境刺激與群體感應 (quorum sensing) 的訊息傳遞路徑下，致病因子受到複雜且精密的調控，進而控制青枯病菌整體的病原性展現 (Valls et al., 2006; Vaillau et al., 2007; Genin and Denny, 2012)。青枯病菌的感染過程中，初期殘存於土壤中的青枯病菌感受到寄主植物根部分泌物之後，便會受趨化性 (chemotaxis) 誘導移動至植物附近，形成生物膜 (biofilm) 進而附著纏據 (root attachment and colonization) (Schell, 2000; Yao and Allen, 2006)，同時表現第三型蛋白分泌系統 (type III secretion system, T3SS) 分泌效應蛋白，送入植物細胞干擾植物正常生理功能 (Poueymiro et al., 2009)。當藉由植物側根生長處或傷口侵入後 (Yao and Allen, 2007)，便可系統性感染整株植物的莖部，沿著木質部 (xylem) 向上增生繁殖、產生大量胞外多醣體 (exopolysaccharides, EPS) 阻塞住植物水分運輸，獲取所需養份的同時導致植物死亡 (Denny, 2006)。

由於青枯病菌的致病過程牽涉廣闊，相關的致病因子極多，包含青枯病菌的趨化性與泳動能力 (motility)、胞外多醣體的產生、第二型蛋白分泌系統 (type II secretion system, T2SS) 及其所分泌之細胞壁水解酵素 (cell wall degradation enzyme) (Liu et al., 2005)、與第三型蛋白分泌系統等 (Peeters et al., 2013)。本研究的對象為青枯病菌的第三型分泌效應蛋白 (Type III effectors, T3Es)。

4. 青枯病菌第三型分泌蛋白 T3Es

在青枯病菌中，在其 1.9-Mb 的大質體中第三型分泌蛋白調控系統之 *hrp* 基因群大約佔有 23 kb，分成至少六個轉錄單位，編譯出超過 20 個聚胜肽鏈，組成橫跨內外膜的蛋白分泌系統 (Arlat et al., 1992)。病原菌首先透過外膜接受體 PrhA receptor 感受植物訊號之後，將訊息傳遞給內膜蛋白 PrhR，使原本與 PrhR 相結合

的 sigma factor PrhI 分離釋放到細胞質當中，啟動 *prhJ* 的表現，轉錄因子 PrhJ 會進一步活化 *hrpG*，HrpG 再誘導 *hrpB* 的表現，最終由 HrpB 調控下游的第三型分泌蛋白之表現，HrpB 會活化啟動子帶有 *hrpII* box 序列 TTCTG-N₁₆-TTCTG 的基因，研究發現若改變此段保守性序列，會影響到啟動子具有 *hrpII* box 的 *popABC*、*hrpY* 基因表現 (Cunnac et al., 2004a)。且整個訊號傳遞的路徑都會受到致病中樞調控因子 PhcA 所管控 (Peeters et al., 2013) (附圖一)。此外，HrpG 的旁系同源蛋白 (paralogue) PrhG 也被證實具有活化 *hrpB* 的功能，但 *prhG* 只會在基本培養基 (minimal medium) 中被誘導表現，卻不受到植物細胞的訊號所活化 (Plener et al., 2010)。第三型分泌蛋白調控系統對於青枯病菌的致病非常重要，研究顯示將青枯病菌的任一 *hrp* 基因突變後，會使青枯病菌在感病植物上失去致病力，同時也會失去在抗病植物上誘導過敏性反應的能力 (Van Gilsegem et al., 1995)。

隨著首個青枯病菌菌株 GMI1000 的基因組解序，透過生物資訊及轉錄體學的分析，青枯病菌的效應蛋白被發現具有以下三個特性 (Deslandes and Genin, 2014; Kazan and Lyons, 2014)：第一，單一青枯病菌菌株的效應蛋白數量遠多於其他植物病原菌，平均一個青枯病菌菌株就具有 60-80 個 T3Es 會被送入植物體 (Cunnac et al., 2004b)，相較於 *Xanthomonas* spp. 與 *P. syringae* 的 30-45 個，這可能也是青枯病菌寄主範圍極廣的原因 (Poueymiro and Genin, 2009; Genin and Denny, 2012)，但僅有少數蛋白的功能被分析。第二，青枯病菌各菌株間擁有的效應蛋白彼此差異性很高，推測是由於青枯病菌容易透過水平基因轉移 (horizontal gene transfer) 獲得新的效應蛋白 (McCann and Guttman, 2008)，有些可能來自真核細胞，如帶有 F-box domain 的 GALA 蛋白 (Angot et al., 2006)；有些則可能來自其他動、植物病原菌，如 TAL (transcriptional activator-like) 蛋白，其被認為源自於 *Xanthomonas* spp. 的 TAL 蛋白，且同樣被證實座落在植物細胞核並具有在植物細胞中作為轉錄活化因子 (transcriptional activator) 的功能 (Li et al., 2013)。第三，青枯病菌的效應蛋白往往以家族 (family) 的形式出現，如 GALA 家族、SKWP 家族 (Poueymiro and Genin, 2009)，推測青枯病菌為了適應廣泛的寄主植物，而發展出相似蛋白卻功能多樣的演化形式 (Remigi et al., 2011)。

關於青枯病菌效應蛋白的研究，近年來集中在以生物資訊方法、或透過功能性篩選來尋找未知的效應蛋白 (Deslandes and Genin, 2014; Kazan and Lyons, 2014)，唯僅有少數效應蛋白有被深入研究，舉例敘述如下：



4.1 Harpin

許多革蘭氏陰性植物病原菌的 *hrp* 基因群會轉譯出一種稱為 harpin 的蛋白，該蛋白的共同特性為：熱穩定 (heat-stable)、胺基酸序列中富含 glycine 且會誘導抗病植物的過敏性反應 (Kanda et al., 2003)。PopA (*Pseudomonas outer protein A*) 為青枯病菌中第一個被發現的 harpin (Arlat et al., 1992)，此效應蛋白作用於植物細胞間隙，可誘導菸草的過敏性反應，並與 *popB* (*Pseudomonas outer protein B*)、*popC* (*Pseudomonas outer protein C*) 共為調控組 (operon)，受 HrpB 所調控。研究發現注射帶有 *popA* 之青枯病菌於菸草葉中，*popA* 於半小時內就會高度表現，但卻會失去誘導過敏性反應的能力；而持續表現 *popA* 之青枯病菌在菸草澆灌試驗中致病力下降，但直接莖部注射試驗卻不影響其致病能力。顯示 PopA 在青枯病菌早期感染時會受到菸草所辨認，使菸草在辨認到病原菌入侵時即引發防禦反應 (Kanda et al., 2003)。

4.2 GALA 家族

GALA 家族之效應蛋白在青枯病菌中含有七個成員，分別為 GALA1-7，其共同特性在於胺基酸序列中含有植物特有之 leucine-rich repeats (LRR) 與真核生物 (eukaryote) 之 F-box domain；其中在 LRR 序列裡，更具有保守性 GAXALA 的序列，因而稱為 GALA 家族 (Angot et al., 2006)。*ΔgalA1-7* 之突變株在阿拉伯芥與番茄中會降低致病力 (Angot et al., 2006)，其中又以 GALA2、3、6、7 對感染阿拉伯芥較為重要，GALA3、7 則為感染番茄所必須 (Remigi et al., 2011)；此外，GALA7 為造成苜蓿 (*Medicago truncatula*) 致病所不可或缺的蛋白，且其 F-box domain 對於 GALA7 的致病也十分關鍵，F-box 蛋白被認為是真核蛋白中與 SKP1-like 蛋白交互作用之區域，而 SKP1-like 蛋白又會與 Cullin1 蛋白交互作用，共同形成 SCF-type E3 ubiquitin ligase，造成蛋白質的泛素化 (ubiquitination) 與降解 (Angot et al., 2006)。因此，GALA 家族被認為會透過干擾寄主植物的泛素化降解途徑，去影響植物的生理功能，而不同的 GALA 家族成員在不同植物上所造成的致病能力也不同，推測 GALA 家族成員間仍有功能差異，為的是適應廣泛的寄主植物。

4.3 AvrA

青枯病菌 AvrA 效應蛋白，被發現是菸草 *N. tabacum* 與 *N. benthamiana* 中最主要的辨識對象，*avrA* 突變株會失去在 *N. tabacum* 與 *N. benthamiana* 上誘導過敏性反應的能力，其中胺基酸第 32 號到第 50 號序列，此 18 個胺基酸為產生過敏反應的重要區域。由於 AvrA 序列中存在有大量的重複序列 (tandem repeats)，每個序列包含 12 個鹼基對 (base pairs)，且部份序列轉譯後剛好位於第 32 到 50 號胺基酸之間，顯示這些重複序列在演化上最終受到菸草所辨認 (Poueymiro et al., 2009)。

4.4 YopJ superfamily

在青枯病菌重要且被深入研究之效應蛋白中，包括 PopP 家族，隸屬於 YopJ (*Yersinia* outer protein J) superfamily，為第三型分泌蛋白中的一個巨大家族，最早在動物的腸道科病原菌 *Yersinia pseudotuberculosis* 中被發現 (Monack et al., 1997)，而其同系物 (homologue) 廣泛存在於各種不同的動、植物病原菌當中，包括動物病原菌 *Salmonella* spp. 的 AvrA；植物病原菌 *Pseudomonas* spp. 的 HopZ 家族，*Xanthomonas* spp. 的 AvrRxv、AvrXv4、AvrBsT、XopJ，*Pectobacterium* spp. 的 ORFB，*R. solanacearum* 的 PopP 家族；以及植物共生菌 *Rhizobium* spp. 的 Y4LO (Lewis et al., 2011)。

在青枯病菌中有三個隸屬 YopJ superfamily 的效應蛋白統稱為 PopP (*Pseudomonas* outer protein P)，分別為 PopP1、PopP2 及 PopP3。研究發現青枯病菌 GMI1000 *popP1::Tn* 突變株在感染抗病植物矮牽牛 (*Petunia*) 後會造成植物死亡、感病植物阿拉伯芥與番茄的萎凋情形則會略微提升，而原本沒有 PopP1 的青枯病菌 Rd15 菌株，在表現 PopP1 後會導致該菌株在原本感病的矮牽牛上毒力下降 (Lavie et al., 2002)，且以農桿菌短暫表現 PopP1 於菸草葉中會產生過敏性反應，表示 PopP1 受菸草所辨識，顯示 PopP1 在青枯病菌中為 avirulence protein 的角色 (Poueymiro et al., 2009)。

PopP2 則在阿拉伯芥中被深入探討：GMI1000 $\Delta popP2$ 在感染抗病的阿拉伯芥品系 Nd-1 後，會導致 Nd-1 的死亡，且研究證實 Nd-1 中具有可直接與 PopP2 交互作用的 R 蛋白 RRS1-R，該蛋白 C 端具有在 R 蛋白中從未發現的 WRKY motif (Deslandes et al., 2003)；同時，由 RRS1-R 所誘導的植物抗性需要一個 cysteine 蛋白酶 Rd19 來共同啟動，Rd19 與 RRS1-R 一樣被證實與 PopP2 可直接交互作用

(Bernoux et al., 2008)。PopP2 在 N 端 34-53 個胺基酸序列被預測具有入核序列 (nuclear localization signal, NLS)，實驗結果也驗證 PopP2 確實會進入植物細胞核中，與 RRS1-R 具有相同的座落位置 (Deslandes et al., 2003)；另外，PopP2 被發現可自我乙醯化 (auto-acetylation) 的能力，乙醯化位點在 K383，該胺基酸位點在 YopJ superfamily 成員中保守存在，且 PopP2 自我乙醯化的活性對於 RRS1-R 所誘導的植物抗性是非常重要的 (Tasset et al., 2010)。

5. 植物病害防禦反應

植物的免疫反應係由一套複雜的感知過程與訊號傳遞參與其中，一般而言，目前植物的防禦反應可區分為兩大類：由病原菌身上的保守性分子 pathogen-associated molecular patterns (PAMP) 所誘導的 PTI (PAMP-triggered immunity) 防禦反應，以及透過抗病 R 蛋白去辨識病原菌效應蛋白而啟動的 ETI (effector-triggered immunity) 防禦反應 (Pieterse et al., 2009)。而病原菌為了達成感染植物目的，演化出抑制植物防禦反應的效應蛋白，用以干擾植物的生理功能、抑制寄主之免疫稱為 ETS (effector-triggered susceptibility)。最終病原菌擁有多樣差異化的效應蛋白，而植物體中是否具有專一性可辨認病菌效應蛋白之抗病 R 蛋白，則決定了植物能否啟動專一性較高的免疫系統、產生過敏性反應及 PCD 等以限制病菌擴散而決定宿主的抗病能力 (Deslandes and Genin, 2014; Kazan and Lyons, 2014)。

5.1 植物 PTI 防禦反應

病原菌身上可誘導 PTI 防禦反應的 PAMP，通常為病菌保守 (conserved) 且不可或缺的結構蛋白，如細菌鞭毛蛋白 flagellin、細菌細胞壁成份 peptidoglycan (PGN)、原核生物肽鏈延長因子 (elongation factor Tu, EFTu) 等 (Boller and Felix, 2009)。病原菌接觸到植物時，植物會透過膜上的 pattern recognition receptors (PRRs) 感受到病菌身上的 PAMP，做為積激酶 (kinase) 的 PRR 蛋白便會啟動磷酸化反應 (phosphorylation)，吸引其他蛋白質結合或改變自身結構釋出交互作用蛋白，活化下游的免疫機制。當植物接收到病原菌訊號，首先細胞膜的離子通透性會在很短的時間內發生改變，提升細胞質內的鈣離子含量，誘發植物氣孔 (stomata) 關閉，避免植物繼續接觸病原菌；鈣離子同時也可誘導細胞內 ROS 的生成，ROS 除直接造成細菌生存危害外，更可活化下游的 MAPK

cascades 的訊息傳遞路徑，進而啟動防禦基因表現，或癒傷葡聚糖 (callose) 生合成基因，在植物細胞間隙內累積癒傷葡聚糖，以侷限病原菌的入侵。也因此，PTI 防禦反應為植物對付病原菌的首道防禦系統，其主要特徵為關閉氣孔、鈣離子的增加、快速誘導 ROS 以及堆積癒傷葡聚糖 (Muthamilarasan and Prasad, 2013)。

5.2 植物 ETI 防禦反應

儘管植物 PTI 反應在演化上成功抵擋了大部分病原菌，卻也有病原菌演化出相應的對策來突破 PTI 防線，亦即演化出作為 Virulence factor 的多種不同效應蛋白來干擾植物宿主的正常生理機制、抑制寄主之免疫。然而一旦效應蛋白被植物的 R 蛋白所辨認，那就會誘導植物第二道防禦反應，也就是 ETI 反應。ETI 反應除可誘導細胞內 ROS 的生成，也會活化下游的 MAPK 訊息傳遞路徑，進而啟動許多系統性防禦賀爾蒙相關基因的表現，誘導包括水楊酸 (salicylic acid, SA) GluA 及 PR1a 等相關標誌基因表現 (Milling et al., 2011)、乙烯 (ethylene, ET) PR1b1 和 Osmotin 等生合成相關標誌基因的表現 (Milling et al., 2011) (附表七)，使植物產生系統性免疫反應 (systemic acquired resistance, SAR)，並誘導區域性的細胞死亡 (programmed cell death, PCD) 等訊息傳導，以阻止病原菌繼續入侵植物 (Deslandes and Genin, 2014; Kazan and Lyons, 2014)。

5.3 植物細胞膜構造蛋白參與防禦反應

許多研究皆指出植物細胞膜與其上 protein complexes 對於病害防禦反應扮演關鍵角色 (Poueymiro and Genin, 2009; Bohm et al., 2014)，例如：辨認病菌 PAMPs 之 PRRs 與許多辨認病菌效應蛋白之 R proteins 皆位於植物細胞膜 (Bohm et al., 2014)，並且在許多研究中都指出了 PRR 與 PAMP 兩者之間的對應關係 (Muthamilarasan and Prasad, 2013)，但對於 PRRs 的相關協同作用蛋白 (association proteins)，則是在近幾年陸續被深入研究，例如 PRR FLS2，為一種 leucine-rich receptor kinase，在接受到細菌鞭毛後，即需要在植物細胞膜與另一個 receptor-like kinase BIK1 共同作用，始能誘導下游相關 PTI 傳遞路徑 (Lu et al., 2010)。而對於有關植物細胞膜參與植物相關防禦反應的研究，除了雙層磷脂的構造提供了物理性屏障 (physical barrier) 以外，細胞膜上的磷脂代謝調控亦會對細胞防禦反應產生重要影響，如調控細胞磷脂的酵素 phospholipase，即被證實對於植物細胞

的 PCD 反應及防禦訊息傳導扮演重要角色 (Kim et al., 2014)，又如細胞膜上的特定結構脂筏 (lipid raft)，因其參與調控細胞內的脂質代謝 (Bhat and Panstruga, 2005; Lingwood and Simons, 2010)，且已證實與誘導 PCD 產生之 ROS 累積密切相關 (Mersmann et al., 2010)，故在植物防禦反應的調控上具有關鍵角色 (Fallahi-Sichani and Linderman, 2009)。

脂筏係由磷脂、固醇類 (sterols) 以及相關特殊功能蛋白所構成，廣泛存在於真核生物中包括植物細胞。相關研究指出脂筏在細胞膜的構成穩定上，以及細胞內相關脂質代謝的調控上具有至關重要的角色 (Lingwood and Simons, 2010)，而細胞的相關脂質代謝調控則一直被視為與植物的防禦反應密切相關 (Munnik, 2001)。舉例而言，在植物微生物交互作用中，有些病原菌會在植物細胞中釋出脂質水解酶 (lipid hydrolases)，以破壞寄主細胞的防禦結構，並且使宿主細胞需要藉由細胞膜蛋白所引發或增強的相關防禦機制功能喪失，來達到阻絕植物細胞產生系統性防禦反應之目的 (Shah, 2005)。而病原菌除了以酵素水解的方式破壞植物細胞膜外，亦會藉由干擾植物細胞的氧化態的脂質 (oxidized fatty acid) Oxylinins 的作用，來影響植物細胞生長與防禦反應 (Velloso et al., 2007)。

6. 病原細菌效應蛋白在植物體之作用

依據目前已知之效應蛋白在植物體作用的位置，可大略將病菌之效應蛋白分類：分別為作用於細胞膜、粒線體 (mitochondria)、葉綠體 (chloroplast)、囊泡 (vesicle) 運輸、MAPK 訊息傳遞、與細胞核之效應蛋白 (Deslandes and Rivas, 2012; Bohm et al., 2014)。

6.1 作用於細胞膜之效應蛋白：

植物細胞膜上具有 PRRs 等受體蛋白，以及許多誘導下游防禦反應及調控磷脂代謝的構造，因此宿主細胞膜常成為病原菌效應蛋白的作用目標，如阿拉伯芥細胞膜上的 RIN4 (RPM1-interacting protein 4)，RIN4 為植物免疫反應中負調控蛋白 (negative regulator)，*Pseudomonas* 效應蛋白 AvrB 與 AvrRpm1 就透過誘導 RIPK (RIN4-interacting receptor-like protein kinase) 的磷酸化表現，進而磷酸化其交互作用之蛋白 RIN4，抑制 PTI 反應；其相對應之 R 蛋白 RPM1 也已被找到 (Liu et al., 2011)。*Pseudomonas* 效應蛋白 AvrRpt2 則為 cysteine 蛋白酶 (protease)，

會造成 RIN4 的分解，以抑制植物 PTI 反應 (Afzal et al., 2011)，但其分解的碎片卻也會被 R 蛋白 RPS2 所辨認、啟動 ETI 防禦，故另一 *P. syringae* HopF2 效應蛋白，會與 RIN4 交互作用，避免 AvrRpt2 分解 RIN4 造成 ETI 的活化。

另外，*P. syringae* 的 AvrPto 與 AvrPtoB 也是作用在植物細胞膜上的效應蛋白。AvrPto 會抑制阿拉伯芥及番茄 FLS2 的磷酸化功能，阻止下游的 PTI 訊號傳遞 (Xiang et al., 2008)；AvrPtoB 則是會與 FLS2、FLS2 之共接受體 (co-receptor) BAK1 (BRI1-associated kinase 1) 交互作用，抑制對細菌鞭毛蛋白的感知接受 (Gohre et al., 2008)。而在番茄中，AvrPto 與 AvrPtoB 則會與番茄細胞中的 Pto 激酶交互作用，研究推測 Pto 可能扮演競爭結合 (competitive binding) 的角色，使 AvrPto 遠離 PRR 蛋白，進而誘導植物的 ETI 防禦反應 (Xiang et al., 2008)。

6.2 作用於粒線體之效應蛋白：

真核生物粒線體是管控 PCD 反應的中樞 (Lam et al., 2001)，PCD 反應伴隨的現象包括：細胞質萎縮、核染色質 (chromatin) 聚集、粒線體膨大、液泡 (vacuole) 與葉綠體 (chloroplast) 受損等 (Muthamilarasan and Prasad, 2013)。病原菌感染過程中常誘發真核生物 PCD 反應以防禦病原菌侵染，植物的 HR 反應便是最佳例子之一。因此粒線體為病原菌效應蛋白作用的重要位置之一，先前研究就發現動物病原菌的效應蛋白會透過活化細胞生存訊號 (cell survival signals) 干擾宿主粒線體作用、分解啟動細胞自殺 (apoptosis) 的訊號蛋白 (pro-apoptotic proteins)，抑制細胞自殺以協助病原菌入侵 (Faherty and Maurelli, 2008)。

6.3 作用於葉綠體之效應蛋白：

植物病原菌中被發現座落於葉綠體中的效應蛋白：*P. syringae* HopI1 與 HopN1。HopI1 進入阿拉伯芥植物細胞後，會形成一個大的複合體 (complex)，其蛋白質 C 端與 Hsp70 (heat shock protein 70) 相結合，將細胞質中散落的 Hsp70 集中至葉綠體中，葉綠體為 SA 生合成場所，Hsp70 被認為會影響 SA 的生合成或運輸相關功能 (Jelenska et al., 2010)。而在菸草與番茄中，HopN1 會減低病原菌所誘導的 PCD、ROS 產生、與癒傷葡聚糖累積；研究發現 HopN1 會與植物光系統 (photosystem II, PSII) 之重要成員 PsbQ 結合，造成 PsbQ 的降解進而抑制光系統的活性、抑制 ROS 生成，干擾植物正常生理活動 (Rodriguez-Herva et al., 2012)。



6.4 作用於囊泡運輸之效應蛋白：

在阿拉伯芥中，*P. syringae* 之效應蛋白 HopM1 會累積於植物細胞的反式高基氏體網絡 (trans-Golgi network ,TGN)，與 AtMIN7 (*Arabidopsis thaliana* HopM1 interactor7) 結合，同時造成其降解 (Nomura et al., 2011)。AtMIN7 為囊泡運輸過程之關鍵蛋白，對於植物癒傷葡聚糖之累積扮演重要角色，故 HopM1 會抑制植物細胞壁相關之防禦機制 (Nomura et al., 2006)。

6.5 作用於 MAPK 訊息傳遞之效應蛋白：

MAPK 訊息傳遞為啟動 PTI 及 ETI 防禦不可或缺的一環，過程複雜、牽涉許多磷酸化蛋白酶參與其中，成為效應蛋白作用的重點目標之一：*P. syringae* 效應蛋白 HopAI1 具有 phosphothreonine lyase 的活性，使得阿拉伯芥 MPK3、MPK4 與 MPK6 去磷酸化 (dephosphorylation)，但抑制 MPK4 活性的結果會導致 HopAI1 被 R 蛋白 SUMM2 所辨識、啟動 ETI 防禦 (Zhang et al., 2012)。*P. syringae* 另一效應蛋白 HopF2 則具有 mono-ADP-ribosyltransferase 的活性，會透過核糖基化 (ribosylate) MKK5，抑制其磷酸化功能，干擾阿拉伯芥的防禦反應 (Wang et al., 2010)。

6.6 作用於細胞核之效應蛋白：

許多病原菌會透過直接干預植物防禦基因的表現來影響植物之免疫反應，故細胞核常成為效應蛋白作用的對象，如 TAL (transcription activator-like) 效應蛋白：TAL 效應蛋白為 DNA 結合蛋白 (DNA binding protein)，在 *Xanthomonas* spp. 與 *R. solanacearum* 中皆存在，TAL 蛋白透過模仿真核生物之轉錄因子，直接與寄主 DNA 之啟動子 (promoter) 相結合，活化植物基因、操控免疫反應。*X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) 之 PthXo1 會誘發調控稻米醣類運輸的 OsSWEET11 表現，將醣類轉送給病菌使用 (Yang et al., 2006; Chen et al., 2010)；在胡椒 (pepper) 中，*X. campestris* pv. *vesicatoria* 之 AvrBs3 結合在 UPA20 之啟動子的 UPA box 上，UPA20 為轉錄因子，司職植物細胞擴張 (enlargement) 調控，抗病品系存在有 R 蛋白 Bs3，能夠使植物產生過敏性反應 (Kay et al., 2007)。

6.7 攻擊轉譯之效應蛋白：

而另一類效應蛋白，如 *P. syringe* 的 HopU1，會影響植物 RNA 的代謝 (metabolism) 過程，研究發現 mono-ADP-ribosyltransferase 效應蛋白 HopU1 會 ribosylate 植物中三個葉綠體 RNA 結合蛋白 (chloroplast RNA-binding protein, CP-RBPs)、兩個富含 glycine 之 RNA 結合蛋白 (GR-RBPs)，且會造成其對於 RNA 的結合能力減弱，推測 HopU1 的酵素活性會干擾到植物的轉譯 (Fu et al., 2007)。

7. 前人研究與研究動機

毒力為病原菌致病能力的量化，表示病原菌造成寄主植物致病程度的強弱。關於臺灣青枯病菌之毒力分析，最初是由亞蔬中心王肇芬博士研究團隊定義而定的 (Jaunet and Wang, 1999)，將自臺灣分離而得的 40 株青枯病菌菌株，接種到 6 種不同抗感病番茄品系並紀錄植物萎凋狀況，以統計歸類出不同菌株的毒力，大致可分為六群，也可簡單區分為高、中、低毒力三類，其較具代表性之菌株分別為：高毒力之 Pss190 與 Pss1308、中毒力之 Pss4 以及低毒力之 Pss216。高毒力菌株與中、低毒力菌株的分類依據為其在不同番茄品系中所造成之萎凋率 (附表一)。此外，近年來也有研究透過接種番茄、胡椒與茄子，廣泛性地分析不同 phylotype 的青枯病菌與其在不同寄主上之毒力展現，但並未發現 phylotype 與毒力間有直接關連 (Lebeau et al., 2011)。

關於青枯病菌之研究多數著重於探討致病相關因子，如胞外多醣體、泳動性與植物根部附著力等，而關於青枯病菌的毒力研究非常少，相關資訊缺乏。為了找尋可能決定青枯病菌毒力之候選基因，本研究室與亞洲蔬菜中心王肇芬博士研究團隊及其他國外研究團隊合作，以 comparative genomic analyses 策略比較不同毒力之青枯病菌菌株的基因異同，且聚焦於在病菌-寄主植物交互作用中具關鍵角色的第三型蛋白分泌系統輸出之效應蛋白 (Type III effectors, T3Es)。

在與法國 Christian Boucher 研究員 (INRA-CNRS, Toulouse) 之研究團隊的合作研究中，利用中毒力之 type strain GMI1000 預測之基因序列設計的 microarray 進行的比較分析結果發現一些中/低毒力特有之基因 (附圖二)，其中包括被預測為 T3Es 的 RSp0213 與 RSc3174。本研究室的先前研究證實此二 T3Es 具高度保守性存在於中低毒例菌株、且受 T3SS 調控 (附圖三、四、五)，並採用基因轉移表現策略，將低毒力菌株獨有的 T3Es 轉移表現至高毒力 Pss190 及 Pss1308 的遺傳背

景下表現，結果顯示轉移表現並未影響其在培養基上生長、植物體內增生、在於草上的過敏性反應、生物膜形成以及泳動能力，但在 Pss190 背景下的基因轉移菌株在根部附著能力有下降的情形，Pss1308 背景下則無影響 (附表二)。本研究旨在進一步檢測在 T3Es 基因轉移表現下，青枯病菌在番茄上的毒力表現，並且生物資訊分析輔助下 (附圖六)，瞭解此二 T3Es 是否會受植物辨認和如何誘導植物的相關防禦反應機制。

在與英國 Exeter 大學 Murray Grant 教授研究團隊的合作中，針對不同毒力的青枯病菌菌株 Pss190、Pss1308、Pss4 及 Pss216 (附表三)，我們已完成其全基因組 (包含染色體 DNA 與 megaplasmid) 的定序，並且發現其中一個高毒力菌株 Pss190 特有的基因是被預測為 T3E 之一的 PopP3 (附圖七、八、九)。本研究室的先前研究證實此 T3E 會受 T3SS 調控 (附圖十、十一)，研究結果亦顯示基因轉移表現至中毒力菌株 Pss4 可增強其在番茄上的毒力 (附圖十二)，而將 PopP3 表現於菸草葉片無病徵產生但有利於青枯病菌之生長 (附圖十三、十四、十五)，並推測其在植物粒線體的座落位置與其功能有關，可能藉此影響番茄 PTI 指標之一的癒傷葡聚糖累積 (callose deposition)，以抑制植物 PTI 反應 (附圖十六、十七、十八)。本研究旨在進一步證實 PopP3 粒線體座落位置對其功能之重要性，並檢測此 T3E 在基因轉移表現下，青枯病菌在番茄上的毒力表現，和其功能與 HR 之相關性，以闡明 PopP3 如何抑制植物的相關防禦反應機制。

第二章 材料與方法



1. 供試菌株、質體及菌株培養條件

本研究所使用之菌株與質體的特性和來源列於附表四，培養基配方列於附表五。所有菌株皆由-80°C 保存取出，劃菌於合適之固態培養基或含適當濃度抗生素(附表六)之培養基，挑取菌落後進行實驗。大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 以 Luria Bertani (LB) 培養基於 37°C 培養一天；青枯病菌 (*R. solanacearum*, Rs) 以 CPG 培養基於 28°C 培養兩天；農桿菌以 YEP 培養基於 28°C 培養兩天。

2. 供試植物培育條件

本研究使用之植物為青枯病抗病品系番茄 Hawaii 7996 (BW resistant, BW^R) 與感病品系番茄 L390 (BW susceptible, BW^S)，由亞州蔬菜中心 (Asian Vegetable Research and Development Center) 王肇芬老師所提供。將種子泡水震盪三天後，播於 3 英吋盆，以 2:1 混和之荷蘭土與根基旺培養土中，放置於恆溫 25°C，12 小時光照，12 小時黑暗的人工溫室培育，依實驗需求至適當大小後進行實驗。菸草品系為 *Nicotiana benthamiana* 和 *Nicotiana tabacum* W38，由亞洲蔬菜中心王肇芬老師提供，本實驗室自行繁殖，種子先以撒播方式播於培養土，於人工生長箱培育發芽，一週後移苗至 3 英吋盆，培育於恆溫 25°C，12 小時光照，12 小時黑暗的人工溫室，期間以濃度約 1 g/L 之花寶 2 號施肥，*Nicotiana benthamiana* 四週後進行實驗，*Nicotiana tabacum* 七週後進行實驗。

3. 生物統計分析

本研究以 SAS 統計軟體進行統計分析。所有實驗之數據經統計 Student's *t*-test 分析：* 表示具顯著差異 ($p < 0.05$)，** 表示具極顯著差異 ($p < 0.01$)。

4. 重組質體構築與基因過量表現菌株建構

4.1. DNA 瓊脂糖凝膠電泳 (Agarose Gel Electrophoresis)

4.1.1. 外染瓊脂糖凝膠電泳分析：

依據欲分析之 DNA 片段大小稱取 0.8-1.2%不等之瓊脂糖凝膠，加入 0.5X TBE 緩衝液 (Tris-borate-EDTA buffer)，微波加熱至完全溶解後鑄模，待凝固之後於 0.5X TBE 緩衝液中以 100V/30 分鐘進行電泳分析，分析完畢的瓊脂糖凝膠，浸泡於約 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Ethidium Bromide (EtBr) 溶液中進行外染呈色 15 分鐘，於 UV 燈下檢視 DNA 片段位置與亮度。

4.1.2. 內染瓊脂糖凝膠電泳純化：

如欲回收膠體內 DNA，則使用內染瓊脂糖凝膠。依據欲純化之 DNA 片段大小稱取 0.8-1.2%不等之瓊脂糖凝膠，加入 0.5X TAE 緩衝液 (Tris-acetate-EDTA buffer)，微波加熱至完全溶解，稍冷卻後每 10 mL 加入 0.1 μL 的 50 mg/mL EtBr，搖勻鑄模，待凝固後於 0.5X TAE 緩衝液中以 100V/30 分鐘進行電泳分析，於 UV 燈下檢視 DNA 片段位置與亮度。如欲分析半定量 RT-PCR，則採上述方式製作 TBE 內染瓊脂糖凝膠。

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

4.2.1. Taq PCR (Violet)：

使用特定引子配對 (附表七) 以聚合酶連鎖反應增幅目標 DNA 片段，反應液中以 1 ng 染色體 DNA 作為模板，加入 2 μL 的 10X Taq PCR buffer，1.6 μL 的 2.5mM dNTP，1 μL 的 10 μM forward 引子，1 μL 的 10 μM reverse 引子，2 μL DMSO，0.2 μL 的 Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL)，加入無菌去離子水至 20 μL 。混合均勻後以聚合酶連鎖反應器進行反應。反應溫度與時間如下所示：

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

T：溫度依據引子 Tm 值；t：時間依據增幅長度，1kb/min。

4.2.2. Q5® Taq PCR (Invitrogen)：

使用特定引子配對 (附表七) 以聚合酶連鎖反應增幅目標 DNA 片段，反應液中以 1 ng 染色體 DNA 作為模板，加入 10 μ L 的 5X Q5 PCR buffer，4 μ L 的 2.5mM dNTP，5 μ L 的 10 μ M forward 引子，5 μ L 的 10 μ M reverse 引子，10 μ L 的 5X GC enhance buffer，0.5 μ L 的 Q5 DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)，加入無菌去離子水至 50 μ L。混合均勻後以聚合酶連鎖反應器進行反應。反應溫度與時間如下所示：

Cycle#	Denaturation	Annealing	Polymerization
1	95°C /2 分鐘		
30	95°C /12 秒	T°C /30 秒	72°C /t 分鐘
1			72°C /3 分鐘

T：溫度依據引子 Tm 值，t：時間依據增幅長度，2kb/min。

經 PCR 擴增之產物，取 2 μ L 進行 1% 瓊脂糖凝膠電泳分析，以確定 DNA 長度。

4.3. 質體萃取 (Plasmid Purification)

4.3.1. 大腸桿菌質體萃取：

利用 Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit (Protech technology) 進行大腸桿菌質體萃取，再以 1 % 瓊脂糖凝膠電泳分析確定 DNA 濃度，保存於-20°C 備用。

4.3.2. 青枯病菌與農桿菌質體萃取：

取 1.5 mL 隔夜培養菌液至微量離心管，以 6000 rpm 室溫離心 2 分鐘，去除上清液。加入 150 μ L Solution I 震盪懸浮沈澱菌塊，再加入 300 μ L 新鮮配製的 Solution II，緩慢上下反轉 10 次，靜置於室溫 4 分鐘後加入 225 μ L Solution III，上下反轉 10 次後，以 13000 rpm 室溫離心 10 分鐘。取上清液至新的微量離心管，加入等體積 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1)，上下反轉混勻，以 13000 rpm 室溫離心 10 分鐘使溶液分層。小心取出上層液至新的微量離心管，加入等體積的 isopropanol 及 1/10 體積的 3M NaOAc，放置於-20°C，10 分鐘後以 13000 rpm 室溫離心 10 分鐘，去除上清液，加入 500 μ L 75%酒精沖洗沉澱物，再離心 10 分鐘後去除上清液，打開微量離心管上蓋使酒精揮發 5 分鐘，加入 40 μ L 無菌去離子水回溶質體 DNA，並加入 2 μ L RNaseA (20 μ g/mL)，置於 37°C 30 分鐘，將萃取的質體 DNA 以 1 % 瓊脂糖凝膠電泳進行分析 (Sambrook et al., 1989)。



4.4. DNA 純化 (DNA Purification)

利用 Micro-Elute DNA clean/Extraction Kit (GeneMark) 進行膠體純化，再以 1 % 瓊脂糖凝膠電泳分析以確定 DNA 濃度。

4.5. DNA 限制酶消化水解 (DNA Digestion)

欲進行重組質體之 DNA，載體與目標 DNA 片段進行限制酶 (New England Biolabs) 消化水解，反應液總體積為 50 μL ；欲分析質體 DNA 片段大小，反應液總體積則為 20 μL 。反應液內容如下：

Component	20 μL reaction	50 μL reaction
DNA	0.5 μg	4 μg
10X NEB Buffer	2 μL	5 μL
100X BSA	0.2 μL	0.5 μL
Restriction enzymes	2-4 units	4-8 units
ddH ₂ O	補至總體積 20 μL	補至總體積 50 μL

反應液混合均勻後，於酵素反應溫度 37°C 下反應 2-4 小時 (特殊酵素反應溫度：*Sma*I 為 25°C/ *Sfi*I 為 50°C)。在構築重組質體時，依實驗需求將目標 DNA 加熱 65°C 或 80°C 持續 20 分鐘去除限制酶酵素活性，再加入鹼性磷酸酶 (calf intestinal alkaline phosphatase, CIP) (New England Biolabs) 2 units 去除 DNA 5 端上的磷酸根，於 37°C 下反應 1 小時。最後以 1 % 瓊脂糖凝膠電泳分析。

4.6. DNA 片段接合 (DNA Ligation)

將限制酶酵素切割純化後的目標 DNA 與載體 DNA 之莫耳比例調整為 5: 1 或 20: 1，DNA 總濃度大於 100 ng，加入 1 μL 的 10X T4 ligation buffer 及 0.2 μL 的 T4 DNA ligase (400 U/ μL) (New England Biolabs)，以無菌去離子水補至總體積 10 μL ，均勻混合後於室溫下進行接合反應 16 小時。

4.7. TOPO® 質體構築 (TOPO® Cloning)

將 PCR 擴增之產物利用 pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen)，將目標 DNA 構築於 pCR®8/GW/TOPO®載體上。將新鮮的 PCR 產物 4.5 µL 加入 1 µL salt solution 與 0.5 µL pCR®8/GW/TOPO®載體，室溫下反應至少 1 小時。



4.8. LR 重組互換反應 (LR Recombination)

利用 Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen) 將目標 DNA 以同源重組互換的方式換至欲使用的載體上。本研究使用 pCR8®/GW/TOPO® 載體進行同源重組互換，反應液組成如下：

LR recombination components	Amount (µL)
Entry clone (50-150 ng)	1-8 µL
Destination vector (150 ng/µL)	1 µL
LR Clonase™ II enzyme mix	1 µL
TE buffer, pH 8.0	補至總體積 10 µL

將反應液混合均勻後，置於室溫至少 1 小時進行反應。

4.9. 大腸桿菌勝任細胞熱休克轉型作用 (Heat Shock Transformation)

本研究以大腸桿菌 DH5α 菌株進行質體重組實驗。取總體積一半之接合產物或 TOPO® 質體構築產物或 LR 重組互換反應產物，加入 100 µL 的大腸桿菌勝任細胞 DH5α 菌株 (RBC Bioscience) 中，置於冰上 30 分鐘，放至 42°C 熱刺激 45 秒，使 DNA 進入菌體，迅速置於冰上 2 分鐘，加入 1 mL SOB 液體培養基，於 37°C 以 200 rpm 震盪培養 1 小時。培養後的菌液以 6000 rpm 離心 2 分鐘，去除 800 µL 的上清液，以剩下的上清液懸浮菌塊，將菌液塗抹在含有特定抗生素，或含有特定抗生素、IPTG (20 mg/mL) 及 X-Gal (20 mg/mL) 的 LB 固體培養基，於 37 °C 下隔夜培養 16 小時。

4.10. 電穿孔轉型作用之勝任細胞置備 (Competent Cell Preparation for Electroporation)

本研究除質體重組實驗外，青枯病菌、農桿菌與蛋白質表現用之大腸桿菌，其相關實驗皆採電穿孔轉型作用 (Electroporation) 進行基因改造或質體表現。

4.10.1. 青枯病菌、農桿菌：

由-80°C 新鮮劃菌，於 28°C 生長箱培養兩天後，挑選單一菌落，以添加適當抗生素之合適液體培養基 (青枯病菌：523 液體培養基 / 農桿菌：YEP 液體培養基) 於 28°C 下 200 rpm 隔夜震盪培養。取 50 mL 添加適當抗生素之液體培養基，將隔夜培養之菌液自 O.D.600 為 0.2 開始，於 28°C 震盪培養自 O.D.600 為 0.4-0.6。於 4°C 下以 6000 rpm 離心 3 分鐘，去除上清液後，以 20 mL 冰的無菌去離子水重新懸浮菌塊，4 °C 下以 6000 rpm 離心 3 分鐘，去除上清液，再以 20 mL 無菌水清洗及離心一次。去除上清液，加入 5 mL 冰的 10 % 甘油重新懸浮菌塊，4 °C 下以 6000 rpm 離心 3 分鐘。去除上清液，加入 1 mL 冰的 10 % 甘油重新懸浮菌塊，取 100 μ L 懸浮液分裝至微量離心管，以液態氮急速冷凍，保存於-80 °C 冰箱備用。

4.10.2. 大腸桿菌：

由-80°C 新鮮劃菌，於 37°C 生長箱培養兩天後，挑選單一菌落，以 LB 液體培養基於 37°C 下 200 rpm 隔夜震盪培養。取 50 mL 液體培養基，將隔夜培養之菌液自 O.D.600 為 0.2 開始，於 37°C 震盪培養自 O.D.600 為 0.4-0.6。於 4 °C 下以 6000 rpm 離心 3 分鐘，去除上清液後，以 20 mL 冰的無菌去離子水重新懸浮菌塊，4 °C 下以 6000 rpm 離心 3 分鐘，去除上清液，再以 20 mL 無菌水清洗及離心一次。去除上清液，加入 5 mL 冰的 10 % 甘油重新懸浮菌塊，4 °C 下以 6000 rpm 離心 3 分鐘。去除上清液，加入 1 mL 冰的 10 % 甘油重新懸浮菌塊，取 100 μ L 懸浮液分裝至微量離心管，以液態氮急速冷凍，保存於-80 °C 冰箱備用。

4.11. 電穿孔轉型作用 (Electroporation Transformation)

將勝任細胞與約 50 ng 質體 DNA 混合後，放入事先於冰上預冷的 cuvette 中，置於冰上 5 分鐘，使用 Bio-Red MicroPulser™ 以 2.5 kV /2mm 進行電穿孔作用，並立即加入 1 mL 不含抗生素之液體培養基 (青枯病菌：523 液體培養基 / 農桿菌：YEP 液體培養基 / 大腸桿菌：SOB 液體培養基)，青枯病菌與農桿菌於 28°C 下 200 rpm 震盪培養 2 小時，大腸桿菌則在 37°C 下 200 rpm 震盪培養 1 小時，培養後的菌液以 6000 rpm 離心 2 分鐘，去除 800 μ L 的上清液，以剩下的上清液懸浮菌塊，將菌液塗抹在含有特定抗生素之固體培養基 (青枯病菌：CPG 培養基 / 農桿菌：

YEP 培養基 / 大腸桿菌：LB 培養基)，青枯病菌與農桿菌於 28°C 下培養 2-3 天，大腸桿菌則於 37°C 下培養 16 小時，挑取單一菌落。



4.12. 青枯病菌染色體 DNA 萃取 (Bacterial Genomic DNA Purification)

挑選單一菌落以添加特定抗生素之 523 液體培養基於 28°C 下 200 rpm 隔夜震盪培養，將菌液以 6000 rpm 室溫離心 2 分鐘後去除上清液，加入 300 μ L 的 lysis buffer，以微量吸管用力反覆抽吸，再加入 100 μ L 5M NaCl，反覆抽吸直到混和均勻，以 13000 rpm 室溫離心 10 分鐘後，取上清液至新的微量離心管，加入等體積 chloroform，上下翻轉 50 次至混勻，再以 10000 rpm 室溫離心 10 分鐘分層，小心取出上層溶液至新的微量離心管，加入等體積的 isopropanol 混勻，離心 5 分鐘後去除上清液，再以 500 μ L 75%之酒精沖洗沉澱物，13000 rpm 室溫離心 5 分鐘，將上清液完全移除，自然乾燥約 30 秒後，加入 50 μ L 無菌去離子水回溶 DNA，再加入 2 μ L 的 RNase A (20 μ g/mL)，置於 37°C 30 分鐘，將萃取的青枯病菌染色體 DNA 存放於 -20°C 備用。

5. 青枯病菌效應蛋白功能研究

5.1. 菸草原生質體萃取與蛋白座落位置檢測 (*N. benthamiana* Protoplast Purification and Protein Localization Assay)

取 4 週大 *N. benthamiana* 之年輕葉片，以刀片劃出數道傷口，置於已含 25 mL enzyme solution 之培養皿中，enzyme solution 需先以 50°C 預熱 10 分鐘後冷卻至室溫，菸草葉片在室溫下以 50 rpm 黑暗震盪 3 個小時後，以塑膠滴管吸取含原生質體之酵素溶液以紗布過濾至新的圓底塑膠離心管。以 100 g 離心 2 分鐘，此時會出現不同梯度之原生質體，以塑膠滴管吸取、保留最上層之原生質體，移至新的圓底塑膠離心管中，加入 3 mL W5 緩衝液清洗，再度離心後去除上清液。以 3 mL W5 緩衝液懸浮原生質體，以血球計數器定量原生質體濃度；之後 100 g 離心 2 分鐘，去除上清液，以 K3M 溶液調整原生質體濃度為 10^6 /mL。取預先以 Plasmid Midiprep Purification Kit (GeneMark) 萃取之高濃度質體 DNA (p2GWF7.0-RSp0213-GFP 與細胞膜標記 pm-rk、p2GWF7.0-PopP3-GFP 與粒腺體標記 pBIN-mt-rk) (Nelson et al., 2007) 30 mg 且體積不大於 20 μ L，加至新塑膠離心管，並加

入 200 μ L 懸浮之原生質體，加入 125 μ L PEG solution 後，輕彈離心管使其混合均勻，並在室溫下精準作用 45 分鐘，加入 3 mL W5 緩衝液回溶，以 100 g 離心 2 分鐘，去除上清液，再加入 3 mL W5 緩衝液清洗離心，重複清洗步驟兩次，最後以 1 mL W5 緩衝液懸浮原生質體，移至事先以 0.1% BSA 表面覆蓋處理至少 30 分鐘的六孔盤中，於一般日光燈照射培養，室溫下放置 16-20 個小時。吸取 5 μ L 至貼有環形貼紙之載玻片上，蓋上蓋玻片封片後，以螢光顯微鏡 Confocal microscope 觀察 (modified from Treuter et al., 1993)。

5.2. 效應蛋白於菸草葉片細胞座落位置檢測 (*N. benthamiana* Leaves Protein Localization Assay)

利用帶有表現載體 pMDC83 之農桿菌 GV3101 進行基因短暫表現。-80°C 新鮮劃菌，於 28°C 生長箱培養兩天，以添加 kanamycin 與 rifampin 之 YEP 液體培養基，28°C 下 200 rpm 隔夜震盪培養。將菌液 6000 rpm 離心 2 分鐘後去除上清液，用 10 mL 無菌水回溶菌塊，再次 6000 rpm 離心 2 分鐘後去除上清液，以無菌水回溶調整 O.D.600 為 1，加入 200 μ M 的 acetosyringone (AS)，28°C 下 200 rpm 震盪培養 2 小時。本實驗以 4-5 週大的菸草作為材料，注射菌液前 1 小時每株菸草澆灌約 20 mL 水，使氣孔打開，之後使用 1 mL 針筒從菸草葉背注射菌液至葉部組織當中，並以奇異筆標註注射範圍。感染後的菸草置於 25°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱二至三天，以螢光顯微鏡 Confocal microscope 觀察菸草葉背。

5.3. 青枯病菌毒力測試 (Virulence Test)

將青枯病菌 Pss4 或 Pss190 野生型菌株或基因剔除之菌株，利用表現載體 pUFR047 表現目標基因，由 -80°C 新鮮劃菌，於 28°C 生長箱培養兩天，以 523 液體培養基或添加 gentamycin 之 523 液體培養基於 28°C 下 200rpm 隔夜震盪培養，取 200 μ L 菌液塗盤於 523 固體培養基，隔夜培養後以無菌水洗下菌液，並調整菌液至 O.D.600 為 0.003-0.03 (約 10^6 - 10^7 CFU/mL)，澆灌於人工溫室培育 31-33 天之感病品系番茄 L390 植株，或培育 28-32 天之抗病品系番茄 H7996 植株，每一植株澆灌 25 mL 菌液，放置於 25°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱觀察病徵三到四週，定期紀錄萎凋指數 (wilting score)：0 為無病徵；1 為一片葉片

萎凋；2 為二至三片葉片萎凋；3 為除了頂葉外其餘葉片皆萎凋；4 為全部葉片皆萎凋；5 為植株倒伏死亡。



6. 植物體短暫表現效應蛋白基因與其功能性研究

6.1. 菸草葉部基因短暫表現 (Transient Overexpression in Tobacco)

利用帶有二元表現載體 (binary vector) pCAMBIA1300 之農桿菌 GV3101 進行基因短暫表現。-80°C 新鮮劃菌，於 28°C 生長箱培養兩天，以添加 kanamycin 與 rifampin 之 YEP 液體培養基，28°C 下 200 rpm 隔夜震盪培養。將菌液 6000 rpm 離心 2 分鐘後去除上清液，用 10 mL 無菌水回溶菌塊，再次 6000 rpm 離心 2 分鐘後去除上清液，以無菌水回溶調整 O.D.600 為 1，加入 200 μ M 的 acetosyringone (AS)，28°C 下 200 rpm 震盪培養 2 小時。本實驗以 4-5 週大的菸草作為材料，注射菌液前 1 小時每株菸草澆灌約 20 mL 水，使氣孔打開，之後使用 1 mL 針筒從菸草葉背注射菌液至葉部組織當中，並以奇異筆標註注射範圍。或於注射農桿菌後，再注射以無菌水回溶調整 O.D.600 為 0.3 之青枯病菌突變株 Pss4 *hrpG*⁻。感染後的菸草置於 25°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱觀察或進行後續實驗。

6.2. 番茄短暫性病毒誘導基因過量表現 (Virus-mediated Gene Overexpression)

以表現 potato virus X (PVX) 之二元載體 (pSfinX) 裝載效應蛋白基因，再利用帶有伴隨蛋白 (chaperon) 表現質體 (pSoup) 之農桿菌 MOG101 菌株表現 (Takken et al., 2000)。-80°C 新鮮劃菌，於 28°C 生長箱培養兩天，以添加 kanamycin、tetracyclin 與 rifampin 之 3 mL YEP 液體培養基，28°C 下 200 rpm 隔夜震盪培養；隔天取 1 mL 菌液至 10 mL 含相同抗生素之 YEP 液體培養基，加入 10 mM MES、20 mM acetosyringone 進行隔夜次培養。將菌液 6000 rpm 離心 2 分鐘後去除上清液，用 10 mL 無菌水回溶菌塊，再次 6000 rpm 離心 2 分鐘後去除上清液，以無菌水回溶調整 O.D.600 為 1-1.2，加入 10 mM MgCl₂、10 mM MES、200 mM acetosyringone，置於 28°C 培養 3 小時。感染方式是在 12-18 天大之番茄子葉以 2 μ L 微量吸管尖 (tip) 於葉脈中間製造小傷口，用 1 mL 針筒將菌液注滿子葉，置於 21°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱，等待進行後續實驗。



6.3. 植物體短暫表現基因檢測

6.3.1 植物 RNA 萃取 (RNA Extraction from Plants) :

收取以農桿菌短暫基因表現兩天之菸草葉片，或短暫性病毒誘導基因過量表現後 14 天之番茄葉片，約 0.1 g 植物組織，以 Total RNA Mini Kit (LabPrep™) 抽取植物 RNA。並以 RNase-free DNase I kit (Promega) 進行 DNA 消化水解作用：取 5 µg 的 RNA，加入 5 µL (1U/µL) 之 DNase 酵素、5 µL RNase-free DNase 10X buffer，以 DEPC-H₂O 補至最終體積 50 µL，混合均勻後加入微量離心管內，置於 37 °C 反應 1.5 小時。加入 150 µL 之 DEPC-H₂O 與 200 µL RNA 用 phenol:chloroform (3:1) (pH= 4)，反轉均勻混合 5 分鐘，以 13000 rpm 4°C 離心 15 分鐘，取上清液至新的 1.5 mL 微量離心管，加入 20 µL 的 3 M 醋酸鈉 (pH 5.3) 及 1 mL 100%酒精並混合均勻，置於-80°C 隔夜靜置沉澱。以 4°C 13000 rpm 離心 20 分鐘，去除上清液，加入 500 µL 75% RNA 用酒精清洗沈澱物，以 13000 rpm 離心 2 分鐘後去除上清液，重複此步驟一次，徹底移除上清液後，於無菌操作台內揮發酒精 2 分鐘，以 15 µL DEPC-H₂O 回溶 RNA，保存至-80°C 備用。

6.3.2 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) :

以 Reverse Transcription System kit (Promega) 進行反轉錄聚合酶連鎖反應。取 1 µg RNA，以 DEPC-H₂O 補至 10.2 µL，以 70°C 加熱 10 分鐘，立即置於冰上 3 分鐘。加入 4 µL 25 mM MgCl₂、2 µL 10X reverse transcription buffer、2 µL 10 mM dNTP mix、1 µL Oligo (dT)₁₅ (0.5 µg/µL)、0.4 µL recombinant RNasin ribonuclease inhibitor、0.4 µL Avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (15U/µL)，混合均勻後放入聚合酶連鎖反應器中，以 42°C、1.5 小時進行反應，之後以 95°C、5 分鐘終止酵素反應。合成之 cDNA 以無菌去離子水補至總體積 80 µL，保存於-20°C 備用。

6.3.3 半定量 RT-PCR (Semi-quantitative RT-PCR, sqRT-PCR) :

取 100-200 ng cDNA 作為模板，加入 2 µL 的 10X Taq PCR buffer，1.6 µL 的 2.5mM dNTP，1 µL 的 10 µM forward 引子，1 µL 的 10 µM reverse 引子，0.2 µL 的

Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)，加入無菌去離子水至 50 μ L。混合均勻後以聚合酶連鎖反應器進行反應。反應溫度與時間如下所示：

Cycle#	Denaturation	Annealing	Polymerization
1	94°C /5 分鐘		
35	94°C /30 秒	T°C /30 秒	72°C /t 分鐘

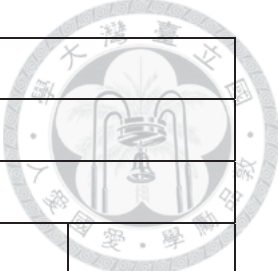
T：溫度依據引子 T_m 值；t：時間依據增幅長度，1kb/min。

反應中間於第 27 個 cycle 暫停反應，取出 15 μ L 反應液至另一微量離心管備用，剩下的反應液則放回聚合酶連鎖反應器中繼續反應，重複上述動作於反應進行至第 30、35 個 cycle。之後將取出之反應液各取 5 μ L，以同一片 1% 內染瓊脂糖凝膠電泳進行分析。

6.3.4 即時定量 Real-time PCR：

本實驗為使用溫度梯度核酸即時定量偵測系統 (Bio-Rad Real-Time PCR Detection Systems，型號 BIO-RAD MyiQ™)，Real-time PCR 反應試劑則是購買 KAPA SYBR® qPCR Kit (Universal, ABI Prism®, Bio-Rad iCycler™, or Roche LightCycler™ 480)。實驗前必須先進行 No Template Control (NTC) 測試，確認是否有 primer dimmer。本研究之實驗反應總體積為 18 μ L，實驗方法如下，首先 cDNA 稀釋為 30 ng/ μ L 後取 8 μ L，加入事先配置好的 cocktail，內含有 9 μ L 2x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix，0.5 μ L 的 forward primer (10 μ M)，0.5 μ L 的 reverse primer (10 μ M)，混合均勻後放入 Real-Time PCR 反應器中進行 PCR 反應，再以 Bio-Rad 研發之 iQ™5 Optical system version 2.0 版軟體，進行分析。

Real-time PCR (qPCR)	
Reaction Component	Amount (μ L)
Template cDNA (100 ~200 ng)	8 μ L
Forward primer (10 μ M)	0.5 μ L
Reverse primer (10 μ M)	0.5 μ L
2x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	9 μ L
Total volume	18 μ L



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

第三章 結果



I. 低/中毒力菌株特有之 T3Es RSp0213 與 RSc3174 在青枯病菌致病力之功能研究

1. RSp0213 與 RSc3174 在已完全解序之青枯病菌菌株中之分佈

為初步瞭解 RSp0213 與 RSc3174 之存在與否是否與菌株毒力表現有相關性，故以目前已解序完整或已有基因組草稿 (genome draft) 的 22 株青枯病菌菌株為對象，分析 RSp0213 與 RSc3174 之存在情形 (表一)。結果顯示在分析的菌株中，中毒力菌株 GMI1000 與 Pss4、低毒力菌株 Pss216 及未知毒力菌株 PSI07 具有 RSp0213，而 GMI1000、Pss216 及 PSI07 菌株也具有 RSc3174 (表一)。本研究室先前利用 Southern blotting 與 genomic DNA PCR 檢測所得結果也獲一致結果 (附圖三)，且在低毒力菌株與 GMI1000 中 RSp0213 與 RSc3174 之胺基酸序列幾乎完全相同 (附圖四)，故這兩個 T3Es 在中毒力及低毒力菌株中皆具有高度保守性。

2. RSp0213 和 RSc3174 對青枯病菌致病力之影響

為了進一步驗證 RSp0213 與 RSc3174 之存在與菌株致病力之表現確實有關連，故以過量表現與基因剔除等研究策略進行其功能分析。首先，這兩個 T3E 基因個別選殖到 low-copy-number 之 pUFR047 載體，並分別轉移到原本不具有該 T3Es 的高毒力菌株 Pss190 中表現，用空載體 (empty vector) 轉型之菌株做為對照組，接著測試轉型菌株在抗病番茄品系 H7996 上之致病力表現 (圖一)。結果顯示 Pss190 菌株表現 RSp0213 後其致病力確實會顯著地降低 ($p < 0.01$)，但 Pss190 菌株表現 RSc3174 後則其致病力雖有下降的趨勢，但與空載體轉型菌株間並不具顯著差異 ($p > 0.05$)。故後續實驗將以 RSp0213 為主要研究對象。

經利用 NCBI Genome 資料庫進行序列比對 (blastp) 發現在青枯病菌 Pss4 中並無 RSp0213 之 paralogs，故初步排除有與 RSp0213 功能重複 (functional redundancy) 之 paralogs 的可能性。為了進一步確認 RSp0213 對青枯病菌致病力的重要性，在中毒力菌株 Pss4 中將 RSp0213 剔除，並比較所得菌株與野生型菌株在感病番茄品系 L390 上之致病力表現。結果顯示將 RSp0213 剔除後其致病力明顯高於野生菌株 (圖二)，綜上結果，RSp0213 之存在不利於青枯病菌之致病力表現。

3. RSp0213 蛋白在植物細胞中之座落位置

為了初步瞭解 RSp0213 進入植物細胞後可能引起的作用，先利用 Softberry 網站 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 分析 RSp0213 可能具有之 functional domains 與在植物細胞中可能的座落位置。結果顯示 RSp0213 的 N 端 47 個胺基酸可能是導向胜肽 (targeting peptide) 及訊息胜肽 (signal peptide, SP)，且預測在此段訊息胜肽中具有跨膜片段 (transmembrane segments)，推測 RSp0213 可能位於細胞膜上 (附圖六)。

為了驗證 RSp0213 在植物細胞內之座落位置，故以與番茄同為茄科植物的圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 做為實驗材料進行 RSp0213 之定位分析。結果顯示 RSp0213::GFP 在菸草原生質體 (protoplasts) 中之座落位置與細胞膜標記蛋白 (membrane marker) PIP2A::mcherry 之分佈一致 (圖三)，而且，在進行影像疊圖處理後 (fold over) 可觀察到 RSp0213::GFP 呈現粒狀結構分佈，推測 RSp0213 應是座落在植物細胞膜上之蛋白質集群 (protein cluster) 而呈點狀分佈。另外，以農桿菌輔助注射法將 RSp0213::GFP 表現於 *N. benthamiana* 葉部後也發現 RSp0213::GFP 之座落位置與 PIP2A::mcherry 分佈一致 (圖四)，顯示 RSp0213 應是座落在植物細胞膜上。

4. RSp0213 過量表現對植物之影響

為了瞭解 RSp0213 對植物之可能作用，故短暫表現將對照組與 35S::RSp0213 導入菸草與番茄，並觀察植物之反應。在 *N. benthamiana* 與 *N. tabacum* W38 葉片上利用農桿菌輔助注射法過量表現 RSp0213，結果顯示，在 *N. benthamiana* 葉片上表現 RSp0213 後 48 小時內即會引起明顯的細胞死亡 (programmed cell death, PCD) (圖五 A)，而空載體對照組處理則未造成影響；在 *N. tabacum* W38 葉部表現 RSp0213 可觀察到細胞死亡現象 (圖五 B，左二圖)，但在表現 RSp0213 的條件下同時處理青枯病菌突變株 Pss4 *hrpG* 則會產生劇烈的 PCD 反應 (圖五 B，右二圖)。

以病毒誘導基因表現 (Virus-mediated gene overexpression, VMGO) 策略，使用 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體，在抗病番茄品系 H7996 系統性表現 35S::RSp0213 後 (圖六)，也同樣會在番茄葉部引起明顯細胞死亡 (圖七 A)，並觀

察到造成番茄植株生長受抑而變矮小 (圖七 B)，顯示番茄可能具有可辨認 RSp0213 之機制。



5. 在番茄表現 RSp0213 對病害反應之影響

為了瞭解表現 RSp0213 是否會影響番茄之青枯病反應，利用 PVX 基因表現載體，在抗病品系番茄 H7996 系統性表現 35S::RSp0213 後，以土壤澆灌方式接種高毒力青枯病菌株 Pss190，並觀察病程發展。結果顯示系統性表現 RSp0213 會極顯著地降低 Pss190 造成之番茄萎凋情形 ($p < 0.01$) (圖八)。

6. 在番茄表現 RSp0213 對防禦反應相關標誌基因 (marker genes) 表現之影響

由上述實驗可知，表現 RSp0213 會影響番茄之青枯病反應，為了進一步釐清病害防禦訊息傳導如何受影響，故檢測系統性過量表現 RSp0213 之抗病番茄品系 H7996 中系統性防禦荷爾蒙與細胞死亡相關指標性標誌基因之表現 (附表七)。結果顯示，與表現 *gfp* 之控制組相比，表現 RSp0213 會大幅度地誘導 SA、ET 及細胞死亡 (PCD) 等訊息傳導之標誌基因的表現 (圖九 A、C、D)，而茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 合成之相關標誌基因的表現則受到抑制 (圖九 B)。顯示在番茄表現 RSp0213 會誘導植物的防禦反應基因之表現。

7. 決定 RSp0213 蛋白在植物細胞中之座落位置的重要區段分析

為了檢驗 RSp0213 的 N 端 47 個胺基酸構成之訊息胜肽 (SP) 對於其座落於植物細胞膜之必要性，故進行片段刪除 (圖十 A)，並觀察 RSp0213::GFP 在 *N. benthamiana* protoplast 與葉部之分佈。結果顯示全長 RSp0213::GFP 之分佈與細胞膜標記蛋白 PIP2A::mcherry 一致，而刪除 N 端訊息胜肽 21 或 47 個胺基酸之 RSp0213::GFP，其分佈則與 free GFP 一致 (圖十 B、圖十一)。故 RSp0213 的 N 端 47 個胺基酸構成之訊息胜肽在茄科植物細胞之細胞膜座落位置確實相當重要，且片段刪除 N 端最具保守性的 21 個胺基酸之 RSp0213 即失去其座落在植物細胞之細胞膜位置。

8. RSp0213 座落於植物細胞膜對其功能之重要性

為了闡明 RSp0213 位於植物細胞膜對其功能是否具重要性，故以 VMGO 將全長與片段刪除之 35S::RSp0213 在抗病番茄品系 H7996 系統性地表現，並檢測番茄之生長與青枯病反應是否改變。結果顯示在表現全長之 RSp0213 在番茄葉部造成明顯細胞死亡，但表現 N 端訊息胜肽 21 或 47 個胺基酸被刪除之 RSp0213 時，則無法造成類似的細胞死亡情形 (圖十二 A)。同樣地，表現全長之 RSp0213 在番茄造成明顯植株生長受抑，但表現 N 端訊息胜肽 21 或 47 個胺基酸被刪除之 RSp0213 則無法觀察到類似的影響 (圖十二 B)。另外，分析 VMGO 處理後之番茄植株對於高毒力青枯病菌株 Pss190 感染之反應也發現，表現全長之 RSp0213 可減緩青枯病之發生，但表現 N 端訊息胜肽 21 或 47 個胺基酸被刪除之 RSp0213 則無法造成類似的效果 (圖十三)。此外，在青枯病菌菌株表現全長之 RSp0213 會導致高毒力菌株 Pss190 之致病力極顯著下降，但表現 N 端訊息胜肽 21 或 47 個胺基酸被刪除之 RSp0213 則失去這種影響 (圖十四)。這些結果顯示 RSp0213 的 N 端訊息胜肽 21 個胺基酸與其植物細胞膜座落特性對此 T3E 在植物中之作用極為關鍵。

II. 高毒力菌株特有之效應蛋白 PopP3 在青枯病菌致病力之功能研究

1. PopP 家族成員在青枯病菌菌株之分佈與序列相似性

如前述，青枯病菌高毒力菌株 Pss190 特有的基因之一是被預測為 T3E 的 PopP3，且屬於在病原菌廣泛存在的 YopJ superfamily 成員 (Lewis et al., 2011)。青枯病菌 GMI1000 具有三個屬於 YopJ superfamily 的成員，分別為 PopP1、PopP2 與 PopP3，其中 PopP1 與 PopP2 具 Avr protein 特性 (Lavie et al., 2002; Deslandes et al., 2003)，但 PopP3 則功能未知。本研究先初步分析 YopJ superfamily 成員之存在與否是否可能與青枯病菌致病力表現有關聯，且瞭解該家族成員間之序列相似性與可能之功能保守性。

首先，以目前已完全解序的 22 株青枯病菌菌株為對象，分析 PopP 家族成員之存在情形 (表二)。結果發現在 Pss190、Pss1308、GMI1000、Pss216、FJAT_91、FJAT_1458、Po82 及 SD54 菌株具有 PopP1；Pss1308、GMI1000、Pss216、FQY_40、FJAT_91、FJAT_1458、Po82、K60、P673、CMR15 及 SD54 菌株具有

PopP2；Pss190、GMI1000 及 Y45 菌株具有 PopP3，但 GMI1000 的 *popP3* 有一跳躍子插入其中。由於除 PopP3 之外的其他 PopPs 家族成員分散於各青枯病菌菌株中，無法歸納它們的存在與青枯病菌菌株特性之關聯性。

以青枯病菌 GMI1000 菌株的 PopP1、PopP2 與 Pss190 菌株的 PopP3 進行胺基酸序列兩兩比對，結果顯示全長序列相同度 (identity)：PopP1 與 PopP2 為 11.6%，PopP1 與 PopP3 為 15%，PopP2 與 PopP3 為 11.7%；而酵素催化區的序列相同度則是：PopP1 與 PopP2 為 30%，PopP1 與 PopP3 為 33%，PopP2 與 PopP3 為 26% (附圖七)。三者之間無論全長或酵素催化區的胺基酸序列都差異甚大，推測 YopJ superfamily 的成員在青枯病菌中也許各有其功能。

進一步，在 NCBI Genome 資料庫具有 PopP3 的所有青枯病菌菌株 (包含基因組未能完全解序的青枯病菌菌株) 中，12 株青枯病菌菌株 (包含 Pss190) 具有 PopP3，而對 PopP3 蛋白質之序列進行序列比對則發現 PopP3 序列在各菌株中具有高度保守性 (附圖八)。

2. 在高毒力菌株 PopP3 之分佈

為了瞭解高毒力 Pss190 菌株所特有的 PopP3 在其他高毒力菌株中的分佈情形，前人研究選擇 3 株 phylotype I 的高毒力菌株 Pss158、Pss365、Pss749，以及 14 株 phylotype II 的高毒力菌株 Pss525、Pss526、Pss1327、Pss1351、Pss1361、Pss1370、Pss1475、Pss1482、Pss1569、Pss1586、Pss1696、Pss1697、Pss1703、Pss1710，進行染色體 PCR 分析。結果發現 phylotype I 中除原本已知具有 PopP3 之 Pss190 與 GMI1000 (GMI1000 為中毒力菌株，在此作為實驗正控制組) 外，尚有 Pss365 具有 PopP3 (附圖九)，而 phylotype II 則未發現有任何菌株具有 PopP3。顯示只有少數高毒力菌株具有 PopP3，其不存在於所有高毒力菌株當中。

3. PopP2 對青枯病菌在番茄上致病力之影響

青枯病菌高毒力菌株 Pss190 並不具有在阿拉伯芥上為 Avr protein 特性之 PopP2 (Deslandes et al., 2003)，但 PopP2 對於青枯病菌在番茄上之致病力表現的影響尚未知。故將 *popP2* 基因選殖到 pUFR047 載體並轉入到 Pss190 表現，經測試轉型菌株在抗病番茄品系 H7996 上之致病力表現後發現，大量表現 *popP2* 會降低高毒力菌株 Pss190 在抗病品系番茄之致病力表現 (圖十五)。



4. PopP3 對病菌誘導之菸草過敏性反應的抑制能力

本研究室先前結果發現在感病品系 *N. benthamiana* 葉部短暫表現 *popP3* 後未產生病徵，而在 *N. tabacum* W38 葉部短暫表現 *popP3* 後亦未產生 PCD 相關之 HR 反應 (附圖十三、十四、十五)。由於有些病菌之 T3Es 具有抑制植物 PCD 反應相關之 HR 反應的功能 (Abramovitch et al., 2003)，為瞭解 PopP3 是否也有類似的作用，故檢測 PopP3 表現對於病菌誘導之菸草 HR 反應的影響。結果顯示，在 *N. tabacum* W38 葉部表現 *popP3* 並不會改變青枯病菌 Pss4 引起之 HR 反應 (圖十六 A)。另外，將 *popP3* 以 pUFR047 載體轉入原本不具有 PopP3 之中毒力菌株 Pss4 中表現後，亦不會改變 Pss4 在 *N. tabacum* W38 葉部誘導之 HR 反應 (圖十六 B)。故 PopP3 可能並未參與抑制植物之 PCD 反應。

5. 在番茄表現 *popP3* 對病害反應之影響

為了瞭解表現 *popP3* 是否會影響番茄之青枯病反應，以 PVX 基因表現載體，在感病品系番茄 L390 系統性表現 35S::*popP3* 後以土盆澆灌方式接種中毒力青枯病菌株 Pss4，並觀察病程發展。結果顯示 Pss4 在系統性表現 *popP3* 的番茄上造成之萎凋情形相較於表現 *gfp* 之控制組顯著地上升 ($p < 0.05$) (圖十七)。

另外，在抗病品系番茄 H7996 系統性表現 35S::*popP3* 後，以土盆澆灌方式接種原本就具有 PopP3 之高毒力青枯病菌株 Pss190，其結果 Pss190 在系統性表現 *popP3* 的番茄上造成之萎凋情形相較於表現 *gfp* 之控制組並無顯著差異 ($p > 0.05$) (圖十八)。綜觀上述兩實驗的結果，顯示在番茄中表現 *popP3* 會抑制植物免疫反應；而在進行 Pss190 處理後，Pss190 之 PopP3 亦產生了抑制 PTI 作用，導致在番茄表現 *popP3* 與青枯病菌 Pss190 存在之 PopP3 功能重複，故不影響 Pss190 致病能力。

6. 決定 PopP3 蛋白在植物細胞中之座落位置的重要區段分析

為了探討 PopP3 進入植物細胞後，其功能性區段 (functional domain) 對 PopP3 在植物細胞中之座落位置的重要性，我們先以 Softberry 網站分析 PopP3 在植物細胞中可能的座落位置，結果發現 PopP3 最有可能位於粒線體 (mitochondria) 上；進一步以 iPSORT 網站 (<http://ipsort.hgc.jp/>) 分析 PopP3 是否帶有訊息肽 (signal

peptide)，發現 PopP3 的 N 端 30 個胺基酸構成了粒線體導向胜肽 (mitochondria targeting peptide, MT) 及訊息胜肽 (SP)，同時預測 PopP3 進入粒線體後切除胜肽位置 (mitochondria cleavage site) 為 N 端前 10 個胺基酸 (圖十九 A)。

而為了驗證 PopP3 的 N 端 30 個胺基酸構成之粒線體導向胜肽對於其座落於植物粒線體之必要性，我們將粒線體導向胜肽片段刪除 (sequence-truncated) 與全長之 PopP3::GFP 分別利用表現載體 p2GWF7.0，轉入 *N. benthamiana* 原生質體進行短暫表現，結果顯示唯有表現全長之 PopP3::GFP 在菸草原生質體中呈現位置與粒線體標記 (mitochondria marker) ScCOX4::RFP 分佈一致，而表現刪除粒線體導向胜肽之 PopP3::GFP 在菸草原生質體中呈現位置則與表現 free GFP 的空載體控制組相同 (圖十九 B)。

7. 片段刪除後之 PopP3 對青枯病菌致病力及對番茄病害反應之影響

進一步，為了驗證 PopP3 之粒線體座落位置對其在番茄之功能是否具重要性，以 VMGO 將全長與片段刪除 MT 之 35S::popP3 在感病番茄品系 L390 系統性地表現，並檢測番茄之青枯病反應是否改變。結果顯示表現全長之 PopP3 增強番茄在 Pss4 處理下的萎凋情形 (圖二十)，而表現粒線體導向胜肽刪除後之 PopP3 則失去這種影響，與表現 GFP 之控制組無顯著差異 ($p>0.05$)。

另外，我們也將全長與片段刪除 MT 之 popP3 基因選殖到 pUFR047 載體，並分別轉移表現至原本不具有該 T3E 的中毒力 Pss4 遺傳背景菌株中，測試在感病品系番茄 L390 上之致病力表現，並以空載體 (empty vector) 轉型菌株做為控制組。結果亦發現，唯有在 Pss4 表現全長之 PopP3 會增強該菌株之致病力表現，而表現粒線體導向胜肽 (MT) 刪除後之 PopP3 則失去這種影響 (圖二十一)。顯示 PopP3 N 端之粒線體訊息胜肽與植物粒線體之座落特性，對此 T3E 在植物中之功能極為重要。

第四章 討論



病原菌感染植物時送入之效應蛋白，依據寄主植物的辨識能力可導致不同的結果 (Alfano and Collmer, 2004)：若 T3E 被植物的 R protein 辨認，植物會啟動快速而激烈的免疫反應，這類的效應蛋白便可稱為 avirulence (Avr) protein；相反地，若效應蛋白未被寄主植物辨認，則可能成功抑制寄主防禦反應或干擾宿主生理功能，以利病原菌成功感染植物而造成病害，這類的效應蛋白便可稱為 virulence protein (Deslandes and Genin, 2014; Kazan and Lyons, 2014)。

一、青枯病菌 RSp0213 之功能研究

1. RSp0213 降低青枯病菌對番茄之致病力

青枯病菌感染寄主植物過程複雜，在環境刺激與群體感應 (quorum sensing) 的訊息傳遞路徑下，致病因子受到複雜且精密的調控 (Valls et al., 2006; Vailleau et al., 2007; Genin and Denny, 2012)，並表現第三型蛋白分泌系統 (T3SS) 分泌效應蛋白，送入植物細胞改變宿主病害反應 (Poueymiro et al., 2009)，但目前關於青枯病菌的毒力研究非常少，相關資訊缺乏。青枯病菌 RSp0213 之表現受 T3SS 所調控 (Cunnac et al., 2004a) (附圖五)，故推測 RSp0213 應是第三型分泌蛋白 (T3E)，但未來尚需進一步確認其被分泌之特性。本研究進一步發現 RSp0213 的存在可使高毒力之青枯病菌在番茄上的致病力下降 (圖一)，而將 RSp0213 自中毒力菌株 Pss4 中剔除則可提高病菌在番茄之致病力 (圖二)，證實 RSp0213 為影響青枯病菌致病力之關鍵因子。前人研究也發現，在原本不具 PopP1 的青枯病菌菌株 Rd15 中表現 PopP1 會導致該菌株在感病寄主矮牽牛上致病力下降，且認為 PopP1 在青枯病菌中為 avirulence protein 的角色 (Lavie et al., 2002)。故我們推測：中/低毒力菌株特有之 RSp0213 藉由 T3SS 被送入植物細胞後，可能會被植物防禦系統辨認而誘導植物產生抗病反應，使病原菌的致病能力受到抑制而呈現致病力較低的表現型，而 phylotype I 青枯病菌高毒力菌株因不具有 RSp0213，得以免於被植物辨認進而有高致病力。另外，由於近年分離得之 phylotype I 青枯病菌高毒力菌株並不具有 RSp0213，故我們推測在青枯病菌的菌種演化過程中，RSp0213 應屬於共通且較為早期的 effector，而寄主植物也已經演化出相關的防禦機制偵測之，並得以成功

對抗之 (請見以下討論)。此外，近期研究指出青枯病菌之 T3SS 在病菌感染初期與後期都會持續表現，顯示 T3SS 在此菌之系統性致病過程中應皆有極關鍵功能 (Poueymiro and Genin, 2009; Monteiro et al., 2012; Stotz et al., 2014)；RSp0213 為青枯病菌致病力相關因子，但在青枯病菌致病力上具有關鍵角色的 RSp0213 究竟是如何參與青枯病菌的致病過程則需要進一步研究，例如：可以在接菌後不同時間點自植體中回收青枯病菌，分析 RSp0213 或其基因啟動子之表現特性，可更深入了解 RSp0213 在致病過程所扮演的角色。

2. 在植物表現 RSp0213 會誘導防禦反應

在特定抗病植物中，病原菌之某些效應蛋白會因被植物辨認而誘導防禦反應，誘發植物之快速局部防禦反應 (Poueymiro et al., 2009; Choi et al., 2013; Kim et al., 2014)，這包括被感染組織之局部細胞死亡的 HR 反應。本研究結果顯示，在 *N. benthamiana* 與 *N. tabacum* W38 葉片注入帶有 RSp0213 表現載體之農桿菌 72 小時後皆會在注入組織引起局部的細胞死亡反應 (圖五)，且在 *N. tabacum* W38 葉部處理僅有 PAMPs 之青枯病菌 T3SS 損壞突變株 *hrpG*⁻ 後，RSp0213 所引起之細胞死亡反應更為強烈 (圖五 B，右二圖)。依據這些結果我們推測在 *N. benthamiana* 與 *N. tabacum* W38 中具有可辨認 RSp0213 之機制，並進而啟動 PCD 反應。

同樣地，以 VMGO 的方式在抗病番茄品系 H7996 全株表現 RSp0213 後，不但會在葉部引發明顯細胞死亡並導致植株生長受抑 (圖七)，也會使植物對高毒力青枯病菌株 Pss190 之抗性增加 (圖八)，顯示 RSp0213 也會被番茄防禦系統辨認而引發植物抗病反應。本研究所得結果也顯示，表現 RSp0213 會強烈誘導 H7996 葉中 SA、ET 及 PCD 訊息傳導路徑之指標基因的表現 (圖九 A、C、D)，而 JA 合成之指標基因的表現則受到抑制 (圖九 B)；同時持續地活化這些防禦訊息傳道路徑不但可以解釋為何表現 RSp0213 的番茄植株之生長嚴重受抑，也指向 RSp0213 被番茄防禦系統辨認而引發植物抗病反應 (Deslandes and Genin, 2014; Kazan and Lyons, 2014)，故在 *N. benthamiana*、*N. tabacum* 及番茄中應該都有可以辨認 RSp0213 之共同對應抗病蛋白質。此外，近年研究顯示番茄青枯病之抗病機制與活化 SA 與 ET 訊息傳導及適當調控活化氧分子 (reactive oxygen species，簡稱 ROS) 累積含量息息相關 (Mersmann et al., 2010; Coll et al., 2011)，也與本研究所得

之結果一致。未來應進一步搜尋辨認 RSp0213 之作用蛋白，以利進一步瞭解茄科植物對抗青枯病菌之分子機制。



3. RSp0213 座落於植物細胞膜對其功能至關重要

病原菌之效應蛋白進入寄主細胞後會移位到特定之胞器以執行其作用，並依其功能來影響下游之訊息傳遞路徑 (Poueymiro and Genin, 2009; Deslandes and Rivas, 2012)。本研究發現 RSp0213 的 N 端具有 targeting peptide 與 signal peptide (SP)，經與 NCBI Genome 資料庫中進行 blastp 序列比對，發現包括 PSI07 及 R229 等九株青枯病菌株的 putative T3E N 端皆具有此 SP 片段 ($E \text{ value} < 10^{-5}$)，且預測在此段訊息胜肽中可能具有跨膜片段 (transmembrane segments) (附圖六)。實驗結果顯示 RSp0213 座落於植物細胞膜上，且呈現點狀分布 (圖三、四)，而其 N 端最具保守性的 21 個胺基酸為此座落特性之必需片段 (圖十、圖十一)，且對其在番茄上誘導抗病反應之特性有決定性的影響 (圖十二、十三、十四)，更顯示此 SP 片段可能對其它 T3Es 座落特性皆具重要性，因此未來可以此 SP 片段接合 GFP 蛋白觀察座落位置，驗證其確切功能。綜合上述實驗結果，我們推測 RSp0213 應是需要座落在植物細胞膜上並形成蛋白質集群 (protein cluster) 方能展現其效應，而在演化的過程中，植物亦已發展出特定之辨認蛋白與細胞膜相關防禦系統，辨識 RSp0213 並誘發防禦反應。

許多研究皆指出植物細胞膜與其上 protein complexes 對於病害防禦反應扮演關鍵角色 (Poueymiro and Genin, 2009; Bohm et al., 2014)，例如：辨認病菌 PAMPs 之 PRRs 與許多辨認病菌效應蛋白之 R proteins 皆位於植物細胞膜 (Bohm et al., 2014)；另外，細胞膜上的磷脂代謝調控亦會對細胞防禦反應產生重要影響，如調控細胞磷脂的酵素 phospholipase，即被證實對於植物細胞的 PCD 反應及防禦訊息傳導扮演重要角色 (Kim et al., 2014)，又如細胞膜上的特定結構脂筏 (lipid raft)，因其參與調控細胞內的脂質代謝 (Lingwood and Simons, 2010)，且已證實與誘導 PCD 產生之 ROS 累積密切相關 (Mersmann et al., 2010)，故在植物防禦反應的調控上具有關鍵角色 (Fallahi-Sichani and Linderman, 2009)。此外，關於效應蛋白作用於植物細胞膜上已有許多案例，例如 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 的 T3E AvrPto 與 AvrPtoB 即為作用在植物細胞膜上的效應蛋白；AvrPto 會抑制阿拉伯芥 FLS2 的磷酸化功能 (Xiang et al., 2008)，阻止下游的 PTI 訊號傳遞；

AvrPtoB 則是會與 FLS2 及 FLS2 之共接受體 (co-receptor) BAK1 (BRI1-associated kinase 1) 交互作用，抑制對細菌鞭毛蛋白的感知接受 (Gohre et al., 2008)；然而在番茄中，AvrPto 與 AvrPtoB 則會與番茄之 Pto 激酶交互作用，且 Pto 可能會吸引 AvrPto 使其遠離 PRR 蛋白，且可能透過磷酸化 AvrPtoB 而抑制其泛素化活性 (Gohre et al., 2008)，進而誘導植物的 ETI 防禦反應。未來可以進一步釣取與 RSp0213 有交互作用之植物蛋白群，以期可搜尋辨認 RSp0213 之作用蛋白與其他訊息傳導相關蛋白質，並進一步探討其交互作用與相關分子機制。

4. RSp0213 誘導植物防禦反應的可能機制

依據目前關於青枯病菌 T3E RSp0213 所得研究結果，我們提出關於其作用機制之初步 model (圖二十二)。我們認為，僅存於中/低毒力青枯病菌之 RSp0213 可能是此菌致病力相關之原始 T3E 之一，藉由 T3SS 調控並送入植物細胞後，於細胞膜上形成蛋白質集群 (protein cluster)，可能負責攻擊植物細胞膜之相關功能。而 *N. benthamiana*、*N. tabacum* 及番茄等茄科植物則已演化出可辨認 RSp0213 之相對應作用蛋白，於感染區引發 PCD 反應，並活化防禦賀爾蒙 SA 與 ET 之系統性訊息傳導路徑，誘發系統性免疫反應，以降低病原菌在植物體的致病能力。未來應進一步搜尋辨認 RSp0213 之作用蛋白與其他 interacting proteins，以利進一步瞭解茄科植物對抗青枯病菌之分子機制，具體闡明其確切分子機制，方能釐清 RSp0213 之具體作用與植物防禦反應的訊息傳導路徑 (Deslandes and Genin, 2014; Kazan and Lyons, 2014)。另外，利用 RSp0213 與其作用蛋白之辨認系統，未來亦可將由廣泛病菌誘導性基因啟動子 (Lin et al., 2014) 控制表現之 RSp0213 導入帶有此作用蛋白之適當茄科作物中，發展具廣泛抗菌性之病害防禦策略。

二、青枯病菌 PopP3 之功能研究

1. 高毒力菌株 Pss190 特有之 T3E PopP3 為青枯病菌重要的致病力因子 (Virulence factor)

水平基因轉移 (horizontal gene transfer, HGT) 被視為青枯病菌快速演化、適應不同生態環境及得以在多種寄主系統成功致病的關鍵因素 (Peeter et al., 2013)。T3E 是青枯病菌致病的關鍵因子，各菌株間具高歧異度，而 T3E 之水平基因轉移

被認為可能是導致青枯病菌致病力差異的原因。在青枯病菌 GMI1000 菌株中 *popP1* 就被認為是透過 HGT 獲得的基因 (Lavie et al., 2002)，在 GMI1000、Po82 與 CMR15 三個菌株之基因組中 *popP2* 都與原噬菌體 (prophage) 之片段相鄰 (Genin and Denny, 2012)，而本研究室檢視已解序青枯病菌菌株也發現在 Pss190、GMI1000 及 Y45 菌株之基因組中 *popP3* 鄰近基因亦與 prophage 片段相鄰，故我們推測 PopP 家族成員可能皆是透過噬菌體感染而水平轉移至青枯病菌基因組中。本研究室先前的研究證實 *popP3* 基因啟動子之表現受 T3SS 控制 (附圖十、十一)，且 PopP3 為青枯病菌表現高毒力之關鍵蛋白 (附圖十二)，但在本土高毒力青枯病菌菌株中卻僅有 Pss190 與 Pss365 有 PopP3 (附圖九)，且依據亞蔬中心王肇芬博士所得資料得知這兩個菌株之高毒力性狀表現比其他也被歸為高毒力之菌株 (Pss1308、Pss749) 穩定，故推測 PopP3 可能是青枯病菌近期經 HGT 而獲得的新穎效應蛋白，也因此植物尚未演化出足以辨識 PopP3 之抗病 R 蛋白 (附圖十三、十四)，而使 PopP3 得以成為青枯病菌的重要 virulence factor，提高青枯病菌之致病力表現。

青枯病菌高毒力菌株 Pss190 並無在阿拉伯芥中會被 R protein 辨認的 Avr protein PopP2 (Deslandes et al., 2003)，而本研究也證實 PopP2 會降低高毒力菌株 Pss190 在抗病品系番茄之致病力 (圖十五)。這些資料顯示，在青枯病菌中，PopP 家族成員對於 Pss190 在番茄上之高致病力表現具重要影響功能，Pss190 除了具有 virulence protein PopP3 之外，也因為不具有在番茄上可能具 Avr protein 特性之 PopP2，而使 Pss190 可規避番茄抗病機制的辨認，進而展現 Pss190 在抗病品系番茄上之高致病力。

2. PopP3 會抑制植物 PTI 反應

病原菌感染過程中常誘發真核生物 PCD 反應，如植物的 HR 反應。本研究室先前實驗結果發現 PopP3 在 *N. benthamiana* 與 *N. tabacum* W38 葉部短暫大量表現後並不會使植物產生病徵或 HR 反應 (附圖十三、十四、十五)。雖然有些病原菌之 T3Es 具有抑制植物 HR 反應的功能 (Abramovitch et al., 2003; Coll et al., 2011)，但本研究所得結果顯示 PopP3 也無法抑制青枯病菌 Pss4 在 *N. tabacum* W38 葉部誘導之 HR 反應 (圖十六)。然而，本研究室先前研究發現 PopP3 會抑制植物 PTI 之癒傷葡聚糖累積 (callose deposition)，並且使番茄對軟腐病細菌 (*Pcc*) 更為感病，

但不影響 flg22 誘導之 ROS 累積 (附圖十六、十七、十八)。由於效應蛋白抑制 HR 並非抑制植物 PTI 反應的必要條件 (Kazan and Lyons, 2014)，因此推測 PopP3 抑制 PTI 反應之路徑可能作用於 HR 誘導路徑之外 (independently)，或可能其作用機制位於 ROS 訊息傳導之下游以抑制癒傷葡聚糖之累積 (Muthamilarasan and Prasad, 2013)，故無涉於調控 ROS 累積與 HR 反應。然而，因先前的 ROS 累積實驗是利用細菌鞭毛蛋白 flg22 進行 PTI 誘導，又青枯病菌的鞭毛素並非其關鍵 PAMP 分子 (Pfund et al., 2004)，因此未來需改以 T3SS 損壞之青枯病菌突變株或煮沸之青枯病菌全萃提取物 (total lysate) 進行 PTI 誘導並檢測 ROS 累積情況，並分析 PTI 指標基因之表現，以深入闡明 PopP3 參與抑制 PTI 反應之具體機制。

另一方面，本研究也探討在番茄中系統性表現 PopP3 是否會影響青枯病反應。結果顯示在感病番茄品系 L390 中系統性表現 PopP3 確實會使 L390 對中毒力之青枯病菌株 Pss4 更為感病 (圖十七)，此結果與 PopP3 會抑制植物 PTI 反應之作用是一致的，故 PopP3 會抑制 L390 偵測到 Pss4 時誘發之 PTI 反應，且更支持 PopP3 是青枯病菌的重要 virulence factor。但有趣的是，在抗病番茄品系 H7996 表現 popP3 卻不會影響 H7996 對青枯病菌 Pss190 之病害反應 (圖十八)；由於 PopP3 之功能為抑制 PTI 反應，我們推測在未處理病原菌情況下，植物未接觸到 PAMPs，因而並未引發 PTI 反應，使得事先在植物體內表現 PopP3 無法造成任何影響；而在接種具有 PopP3 之 Pss190 後，Pss190 送入植物細胞之 PopP3 亦產生了抑制 PTI 作用，所以，在番茄中表現之 PopP3 與 Pss190 送入 PopP3 有相同作用，故未顯著影響 Pss190 之致病能力，而實驗結果再次驗證 PopP3 功能為抑制 PTI 反應。

3. PopP3 座落於植物粒線體對其功能至關重要

真核生物粒線體是管控 PCD 反應的中樞 (Lam et al., 2001)，PCD 反應伴隨的現象包括：細胞質萎縮、核染色質 (chromatin) 聚集、粒線體膨大、液泡 (vacuole) 與葉綠體 (chloroplast) 受損等 (Muthamilarasan and Prasad, 2013)。病原菌感染過程中常誘發真核生物 PCD 反應以防禦病原菌侵染，植物的 HR 反應便是最佳例子之一。因此粒線體為病原菌效應蛋白作用的重要位置之一，先前研究就發現動物病原菌的效應蛋白會透過活化細胞生存訊號 (cell survival signals) 干擾宿主粒線體作用、分解啟動細胞自殺 (apoptosis) 的訊號蛋白 (pro-apoptotic proteins)，抑制細胞自殺以協助病原菌入侵 (Faherty and Maurelli, 2008)。

在真核生物細胞中，具有粒線體導向胜肽 (mitochondria targeting peptide, MT) 之蛋白質會被粒線體表面受體 (receptor) 辨識並與其結合，蛋白質才會被送入粒線體內；尚未被傳輸至粒線體內的蛋白呈現未摺疊的狀態 (unfolded form)，只有當進入粒線體後，粒線體訊息胜肽被切除，蛋白才會在伴隨蛋白 (chaperon) 的幫助下摺疊、產生功能 (Hicks and Galán, 2013)。本研究利用生物資訊分析發現 PopP3 的 N 端 30 個胺基酸構成了 MT 與訊息胜肽 (SP) (圖十九 A)，而進一步實驗也確認此 MT 片段為 PopP3 座落於植物粒線體之必要序列 (圖十九 B)，且對於 PopP3 減低番茄對青枯病菌 Pss4 抗性與增強 Pss4 之毒力具關鍵功能 (圖二十、二十一)。目前被發現座落於真核生物粒線體之病原菌效應蛋白極少，動物病原菌僅有 *E. coli* 之 Map、EspF 及 SopA (Hicks and Galán, 2013)，植物病原菌則僅有 *P. syringe* 之 HopG1 (Hicks and Galán, 2013)，而其中只有 *E. coli* Map 被證實會進入粒線體中，且會打亂粒線體內外膜的離子通透度並造成粒線體斷裂瓦解 (Hicks and Galán, 2013)，而 *P. syringe* 的 HopG1 若未座落於植物粒線體便無法抑制植物生長發育 (Block et al., 2010)。我們推測 PopP3 可能藉由干擾植物粒線體之運作，進而抑制植物之 PTI 或其他防禦反應，然而，目前尚無任何關於真核生物粒線體參與 PTI 確切機制之報導，相關訊息極為缺乏。

4. PopP3 抑制植物 PTI 反應的可能機制與未來展望

依據目前關於青枯病菌 T3E PopP3 所得研究結果，我們提出關於其作用機制之初步 model (圖二十三)。我們認為，穩定表現高毒力之青枯病菌 Pss190 與 Pss365 特有的 PopP3，藉由 T3SS 調控並送入植物細胞後 (附圖十、十一)，會移至粒線體並干擾其特定功能，進而抑制宿主之某些 PTI 反應，例如減少癒傷葡聚醣之累積，使植物對青枯病菌與軟腐病細菌更為感病；而 PopP3 作用之訊息傳遞路徑可能位於 ROS 累積機制之下游，故 PopP3 無涉於調控 ROS 與 HR 反應。

我們的研究指出 PopP3 抑制植物 PTI 反應的功能必須經由與粒線體相關之訊息傳導，然而，目前尚無任何關於真核生物粒線體參與 PTI 確切機制之報導，而 PopP3 是否干擾與如何干擾植物粒線體之運作也未知，且 PopP3 如何抑制植物之 PTI 亦需深入瞭解。為進一步闡明這些重要機制，故未來必須在植物中搜尋 PopP3 之 interacting proteins，以利進一步瞭解 PopP3 干擾番茄抗病反應之具體機制，闡明其確切分子機制與相關訊息傳導路徑 (Gohre et al., 2008; Gimenez-Ibanez

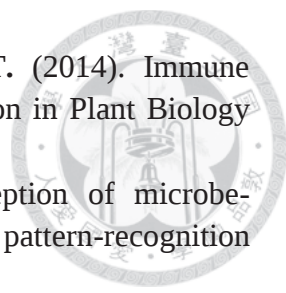
et al., 2009)，並期望可能藉此研擬有助於作物對抗高毒力青枯病菌菌株危害之病害防治策略。



參考文獻

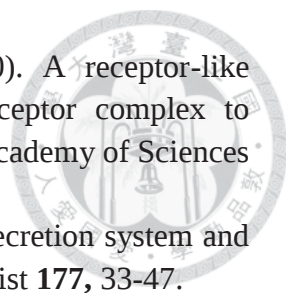


- 李千惠。2009。番茄青枯病菌毒力相關因子之研究。國立臺灣大學植物科學研究所碩士論文。
- 吳紅葳。2013。效應蛋白PopP3在青枯病菌毒力之功能研究與青枯病菌噬菌體裂解蛋白之分析。國立臺灣大學植物科學研究所碩士論文。
- Abramovitch, R.B., Kim, Y.-J., Chen, S., Dickman, M.B., Martin, G.B.** (2003). *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *The European Molecular Biology Organization Journal* **22**, 60-69.
- Afzal, A.J., da Cunha, L., Mackey, D.** (2011). Separable fragments and membrane tethering of *Arabidopsis* RIN4 regulate its suppression of PAMP-triggered immunity. *The Plant Cell* **23**, 3798-3811.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.-L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., Dijk, K., Collmer, A.** (2000). The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4856-4861.
- Alfano, J.R. and Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 385-414.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailleau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., Genin, S.** (2006). *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 14620-14625.
- Arlat, M., Gough, C.L., Zischek, C., Barberis, P.A., Trigalet, A., Boucher, C.A.** (1992). Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular plant-microbe interactions* **5**, 187-193.
- Arnold, R., Brandmaier, S., Kleine, F., Tischler, P., Heinz, E., Behrens, S., Niinikoski, A., Mewes, H.W., Horn, M., Rattei, T.** (2009). Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS Pathogens* **5**, e1000376.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P.J., Marco, Y., Deslandes, L.** (2008). RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *The Plant Cell* **20**, 2252-2264.
- Bhat, R.A., Panstruga, R.** (2005). Lipid rafts in plants. *Planta* **223**, 5-19.
- Block, A., Guo, M., Li, G., Elowsky, C., Clemente, T.E., Alfano, J.R.** (2010). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development and suppresses plant innate immunity. *Cellular Microbiology* **12**, 318-330.

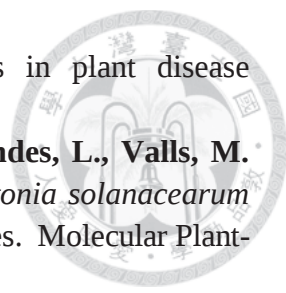
- 
- Bohm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A., Nurnberger, T.** (2014). Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, 47-54.
- Boller, T., Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 379-406.
- Buttner, D., He, S.Y.** (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology* **150**, 1656-1664.
- Cao, Y., Tian, B., Liu, Y., Cai, L., Wang, H., Lu, N., Wang, M., Shang, S., Luo, Z., Shi, J.** (2013). Genome sequencing of *Ralstonia solanacearum* FQY_4, isolated from a bacterial wilt nursery used for breeding crop resistance. *Genome announcements* **1**.
- Chen, F., Gao, M.J., Miao, Y.S., Yuan, Y.X., Wang, M.Y., Li, Q., Mao, B.Z., Jiang, L.W., He, Z.H.** (2010). Plasma membrane localization and potential endocytosis of constitutively expressed XA21 proteins in transgenic rice. *Molecular Plant* **3**, 917-926.
- Choi, H.W., Kim, N.H., Lee, Y.K., Hwang, B.K.** (2013). The pepper extracellular xyloglucan-specific endo-b-1,4-glucanase inhibitor protein gene, *CaXEGIP1*, is required for plant cell death and defense responses. *Plant Physiology* **161**, 384-396.
- Coll, N.S., Epple, P., Dangl, J.L.** (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation* **18**, 1247-1256.
- Cunnac, S., Boucher, C., Genin, S.** (2004a). Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **186**, 2309-2318.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., Genin, S.** (2004b). Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Molecular Microbiology* **53**, 115-128.
- Denny, T.P.** (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In *Plant-Associated Bacteria*, S.S. Gnanamanickam, ed. (Dordrecht, The Netherlands: Springer Science), pp. 573-644.
- Deslandes, L., Genin, S.** (2014). Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, 110-117.
- Deslandes, L., Rivas, S.** (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science* **17**, 644-655.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8024-8029.
- Faherty, C.S., Maurelli, A.T.** (2008). Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis

- during infection. *Trends in Microbiology* **16**, 173-180.
- Fallahi-Sichani, M. and Linderman, J.J.** (2009). Lipid raft-mediated regulation of G-protein coupled receptor signaling by ligands which influence receptor dimerization: a computational study. *PLoS One* **4**, e6604.
- Fegan, M., and Prior, P.** (2006). Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australasian Plant Pathol.* **35**, 93-101.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B.R., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D., Alfano, J.R.** (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**, 284-288.
- Gaudriault, S., Paulin, J.P., Barny, M.A.** (2002). The DspB/F protein of *Erwinia amylovora* is a type III secretion chaperone ensuring efficient intrabacterial production of the Hrp-secreted DspA/E pathogenicity factor. *Molecular Plant Pathology* **3**, 313-320.
- Genin, S., Denny, T.P.** (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 67-89.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., Rathjen, J.P.** (2009). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Current Biology* **19**, 423-429.
- Gohre, V., Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W., Robatzek, S.** (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Current Biology* **18**, 1824-1832.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P.** (1994). The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **25**, 989-994.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hayward, A.C.** (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 65-87.
- Hicks, S.W., Galán, J.E.** (2013). Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nature reviews Microbiology* **11**, 316-326.
- Jaunet, T.X., Wang, J.F.** (1999). Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* **89**, 320-327.
- Jelenska, J., van Hal J.A., Greenberg, J.T.** (2010). *Pseudomonas syringae* hijacks plant stress chaperone machinery for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 13177-13182.
- Jones, J.D., Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kanda, A., Yasukohchi, M., Ohnishi, K., Kiba, A., Okuno, T., Hikichi, Y.** (2003). Ectopic expression of *Ralstonia solanacearum* effector protein PopA early in invasion results in loss of virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 447-455.
- Karimi, M., Inze, D., Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-

- mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**, 193-195.
- Karimi, M., Meyer, B.D., Hilson, P.** (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* doi: 10.1016/j.tplants.2005.01.008.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U.** (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**, 648-651.
- Kazan, K., Lyons, R.** (2014). Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *The Plant Cell* doi: 10.1105/tpc.114.125419.
- Kim, D.S., Jeun, Y., Hwang, B.K.** (2014). The pepper patatin-like phospholipase CaPLP1 functions in plant cell death and defense signaling. *Plant Molecular Biology* **84**, 329-344.
- Koncz, C., Schell, J.** (1986). The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* **204**, 383-396.
- Lam, E., Kato, N., Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., Boucher, C.** (2002). PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1058-1068.
- Lebeau, A., Daunay, M.C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J.F., Dintinger, J., Chiroleu, F., Wicker, E., Prior, P.** (2011). Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* **101**, 154-165.
- Lewis, J.D., Lee, A., Ma, W., Zhou, H., Guttman, D.S., Desveaux, D.** (2011). The YopJ superfamily in plant-associated bacteria. *Molecular plant pathology* **12**, 928-937.
- Li, L., Atef, A., Piatek, A., Ali, Z., Piatek, M., Aouida, M., Sharakuu, A., Mahjoub, A., Wang, G., Khan, S., Fedoroff, N.V., Zhu, J.K., Mahfouz, M.M.** (2013). Characterization and DNA-Binding Specificities of *Ralstonia* TAL-Like Effectors. *Molecular Plant* doi: 10.1093/mp/sst006.
- Lin, Y.-M., Shih, S.-L., Lin, W.-C., Wu, J.-W., Chen, Y.-T., Hsieh, C.-Y., Guan, L.-C., Lin, L., Cheng, C.-P.** (2014). Phytoalexin biosynthesis genes are regulated and involved in plant response to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant Science* **224**, 86-94.
- Lingwood, D., Simons, K.** (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* doi: 10.1126/science.1174621.
- Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.J., Coaker, G.** (2011). A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host and Microbe* **9**, 137-146.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A., Denny, T.P.** (2005). Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 1296-1305.

- 
- Lu, D.,** Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 496-501.
- McCann, H.C., Guttman, D.S.** (2008). Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *The New Phytologist* **177**, 33-47.
- Mersmann, S., Bourdais, G., Rietz, S., Robatzek, S.** (2010). Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiology* **154**, 391-400.
- Milling, A., Babujee, L., Allen, C.** (2011). *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *PLoS One* **6**, e15853.
- Monack, D.M., Mecsas, J., Ghor, N., Falkow, S.** (1997). *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10385-10390.
- Monteiro, F., Sole, M., van Dijk, I., Valls, M.** (2012). A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 557-568.
- Munnik, T.** (2001). Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in Plant Science* **5**, 227-233.
- Muthamilarasan, M., Prasad, M.** (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences* **38**, 433-449.
- Nelson, B.K., Cai, X., Nebenfuhr, A.** (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *The Plant Journal* **51**, 1126-1136.
- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., Pumphlin, N., Jones, J., He, S.Y.** (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**, 220-223.
- Nomuraa, K., Meceya, C., Lee, Y.N., Imboden, L.A., Chang, J.H., He, S.Y.** (2011). Effector-triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity-associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10774-10779.
- Parsot, C., Hamiaux, C., Page, A.L.** (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 7-14.
- Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., Valls, M.** (2013). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular Plant Pathology* doi: 10.1111/mpp.12038.
- Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Allen, C., Bent, A.F.** (2004). Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 696-706.

- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**, 308-316.
- Plener, L., Manfredi, P., Valls, M., Genin, S. (2010). PrhG, a transcriptional regulator responding to growth conditions, is involved in the control of the type III secretion system regulon in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **192**, 1011-1019.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C., Genin, S. (2009a). Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 538-550.
- Poueymiro, M. and Genin, S. (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology* **12**, 44-52.
- Remenant, B., Babujee, L., Lajus, A., Medigue, C., Prior, P., Allen, C. (2012). Sequencing of K60, type strain of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **194**, 2742-2743.
- Remenant, B., de Cambiaire, J.C., Cellier, G., Jacobs, J.M., Mangenot, S., Barbe, V., Lajus, A., Vallenet, D., Medigue, C., Fegan, M., Allen, C., Prior, P. (2011). *Ralstonia syzygii*, the Blood Disease Bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PLoS One* **6**, e24356.
- Remigi, P., Anisimova, M., Guidot, A., Genin, S., Peeters, N. (2011). Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. *The New Phytologist* **192**, 976-987.
- Rodriguez-Herva, J.J., Gonzalez-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antunez-Lamas, M., Rio-Alvarez, I., Li, Z., Lopez-Torrejon, G., Diaz, I., Del Pozo, J.C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodriguez-Palenzuela, P., Lopez-Solanilla, E. (2012). A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cellular Microbiology* **14**, 669-681.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choise, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., Boucher, C.A. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497-502.
- Samudrala, R., Heffron, F., McDermott, J.E. (2009). Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. *PLoS Pathogens* **5**, e1000375.
- Schell, M.A. (2000). Control of Virulence and Pathogenicity Genes of *Ralstonia solanacearum* by an Elaborate Sensory Network. *Annual Review of Phytopathology* **38**, 263-292.

- 
- Shah, J.** (2005). Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 229-260.
- Solé, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K.H., Jones, J.D.G., Deslandes, L., Valls, M.** (2012). The *awr* gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors displaying virulence and avirulence activities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 941-953.
- Stotz, H.U., Mitrousis, G.K., de Wit, P.J.G.M., Fitt, B.D.L.** (2014). Effector-triggered defense against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science* **1-10**.
- Takken, F.L., Luderer, R., Gabriels, S.H., Westerink, N., Lu, R., de Wit, P.J., Joosten, M.H.** (2000). A functional cloning strategy, based on a binary PVX-expression vector, to isolate HR-inducing cDNAs of plant pathogens. *The Plant Journal* **24**, 275-283.
- Tang, X., Xiao, Y., Zhou, J.M.** (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 1159-1166.
- Tasset, C., Bernoux, M., Jauneau, A., Pouzet, C., Briere, C., Kieffer-Jacquiod, S., Rivas, S., Marco, Y., Deslandes, L.** (2010). Autoacetylation of the *Ralstonia solanacearum* effector PopP2 targets a lysine residue essential for RRS1-R-mediated immunity in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens* **6**, e1001202.
- Treuter, E., Nover, L., Ohme, K., Scharf, K.D.** (1993). Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Molecular and General Genetics* **240**, 113-125.
- Troisfontaines, P., Cornelis, G.R.** (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* **20**, 326-339.
- Vailleau, F., Sartorel, E., Jardinaud, M.-F., Chardon, F., Genin, S., Huguet, T., Gentzbittel, L., Petitprez, M.** (2007). Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 159-167.
- Valls, M., Genin, S., Boucher, C.** (2006). Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens* **2**, e82.
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P., Boucher, C.** (1995). The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular Microbiology* **15**, 1095-1114.
- Vellosillo, T., Martinez, M., Lopez, M.A., Vicente, J., Cascon, T., Dolan, L., Hamberg, M., Castresana, C.** (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell* **19**, 831-846.
- Wang, Y., Li, J., Hou, S., Wang, X., Li, Y., Ren, D., Chen, S., Tang, X., Zhou, J.M.** (2010). A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits *Arabidopsis*

- mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant Cell* **22**, 2033-2044.
- Weber, E., Koebnik, R.** (2005). Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **187**, 6175-6186.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., Zhou, J.M.** (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology* **18**, 74-80.
- Yang, B., Sugio, A., White F.F.** (2006). Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10503–10508.
- Yao, J., Allen, C.** (2006). Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **188**, 3697-3708.
- Yao, J., Allen, C.** (2007). The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *Journal of Bacteriol.* **189**, 6415-6424.
- Zhang, Z., Wu, Y., Gao, M., Zhang, J., Kong, Q., Liu, Y., Ba, H., Zhou, J., Zhang, Y.** (2012). Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell Host and Microbe* **11**, 253-263.
- Zhou, H., Lin, J., Johnson, A., Morgan, R.L., Zhong, W., Ma, W.** (2011). *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1 targets a host enzyme to suppress isoflavone biosynthesis and promote infection in soybean. *Cell Host and Microbe* **9**, 177-186.

表一、RSp0213 及 RSc3174 在基因組已完全解序之青枯病菌菌株中之分析

Strain ^a	Sequence status	Host origin	Virulence ^b	Phylotype	Rs effectors	
					RSp0213	RSc3174
Pss190	draft	tomato	high	I	— ^d	—
Pss1308	draft	tomato	high	I	—	—
GMI1000	complete	tomato	medium	I	+	+
Pss4	draft	tomato	medium	I	+	—
Pss216	draft	tomato	low	I	+	+
Rd15	draft	radish	n.d. ^c	I	—	—
FQY_40	complete	bacterial wilt nursery	n.d.	I	—	—
Y45	draft	tobacco	n.d.	I	—	—
FJAT_91	draft	tomato	n.d.	I	—	—
FJAT_1458	draft	tomato	n.d.	I	—	—
Po82	complete	potato	n.d.	II	—	—
CFBP2957	draft	tomato	n.d.	II	—	—
IPO1609	draft	potato	n.d.	II	—	—
UW551	draft	geranium	n.d.	II	—	—
Molk2	draft	banana	n.d.	II	—	—
K60	draft	tomato	n.d.	II	—	—
P673	draft	tomato	n.d.	II	—	—
CMR15	complete	tomato	n.d.	III	—	—
PSI07	complete	tomato	n.d.	IV	+	+
BDB R229	draft	banana	n.d.	IV	—	—
RALSY R24	draft	clove	n.d.	IV	—	—
SD54	draft	ginger	n.d.	IV	—	—

^a 菌株資料參考 Genin and Denny, 2012 文章，並整理自 NCBI 資料庫。

^b 毒力：根據亞洲蔬菜中心王肇芬博士團隊依照菌株在不同抗感病番茄品系之致病力高低所定義 (Jaunet and Wang, 1999)。

^c n.d.：not determined，未定義。

^d 於 NCBI Genome 資料庫中搜尋 (blastn)，E value < 10⁻⁵ 者定義為 +，反之則為—。

表二、PopP 家族成員在基因組已完全解序之青枯病菌菌株中之分析

Strain ^a	Sequence status	Host origin	Virulence ^b	Phylotype	Rs PopP effectors		
					<i>popP1</i>	<i>popP2</i>	<i>popP3</i>
Pss190	draft	tomato	high	I	+ ^d	—	+
Pss1308	draft	tomato	high	I	+	+	—
GMI1000	complete	tomato	medium	I	+	+	+(transposon) ^e
Pss4	draft	tomato	medium	I	—	—	—
Pss216	draft	tomato	low	I	+	+	—
Rd15	draft	radish	n.d. ^c	I	—	—	—
FQY_40	complete	bacterial wilt nursery	n.d.	I	—	+	—
Y45	draft	tobacco	n.d.	I	—	—	+
FJAT_91	draft	tomato	n.d.	I	+	+	—
FJAT_1458	draft	tomato	n.d.	I	+	+	—
Po82	complete	potato	n.d.	II	+	+	—
CFBP2957	draft	tomato	n.d.	II	—	—	—
IPO1609	draft	potato	n.d.	II	—	—	—
UW551	draft	geranium	n.d.	II	—	—	—
Molk2	draft	banana	n.d.	II	—	—	—
K60	draft	tomato	n.d.	II	—	+	—
P673	draft	tomato	n.d.	II	—	+	—
CMR15	complete	tomato	n.d.	III	—	+	—
PSI07	complete	tomato	n.d.	IV	—	—	—
BDB R229	draft	banana	n.d.	IV	—	—	—
RALSY R24	draft	clove	n.d.	IV	—	—	—
SD54	draft	ginger	n.d.	IV	+	+	—

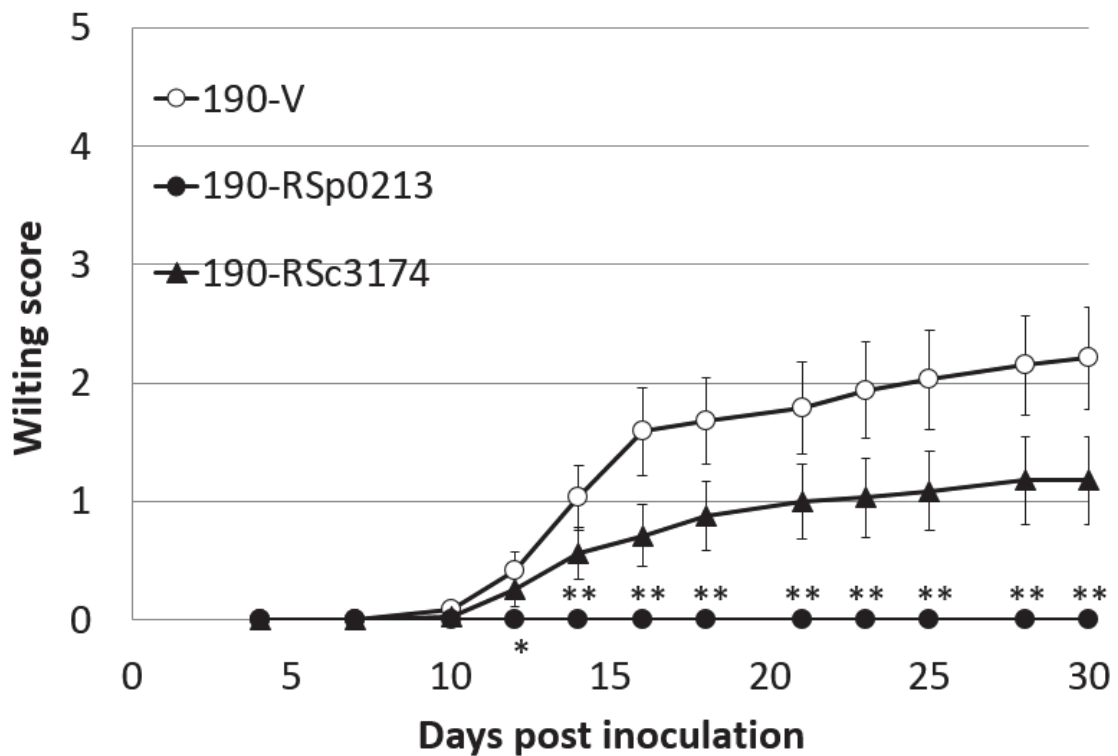
^a 菌株資料參考 Genin and Denny, 2012 文章，並整理自 NCBI 資料庫。

^b 毒力：根據亞洲蔬菜中心王肇芬博士團隊依照菌株在不同抗感病番茄品系之致病力高低所定義 (Jaunet and Wang, 1999)。

^c n.d.：not determined，未定義。

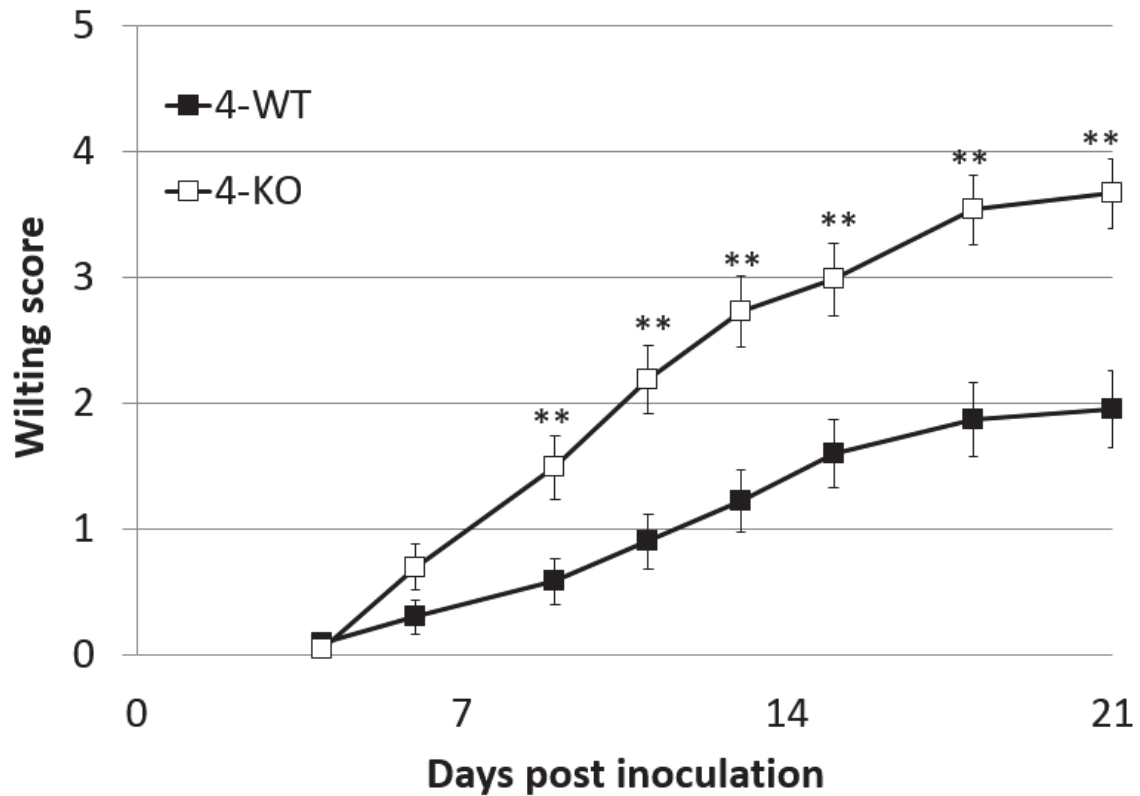
^d 於 NCBI Genome 資料庫中搜尋 (blastn)，E value < 10⁻⁵ 者定義為 +，反之則為—。

^e 有一 1467 bp 跳躍子 (transposon) 插入其中。



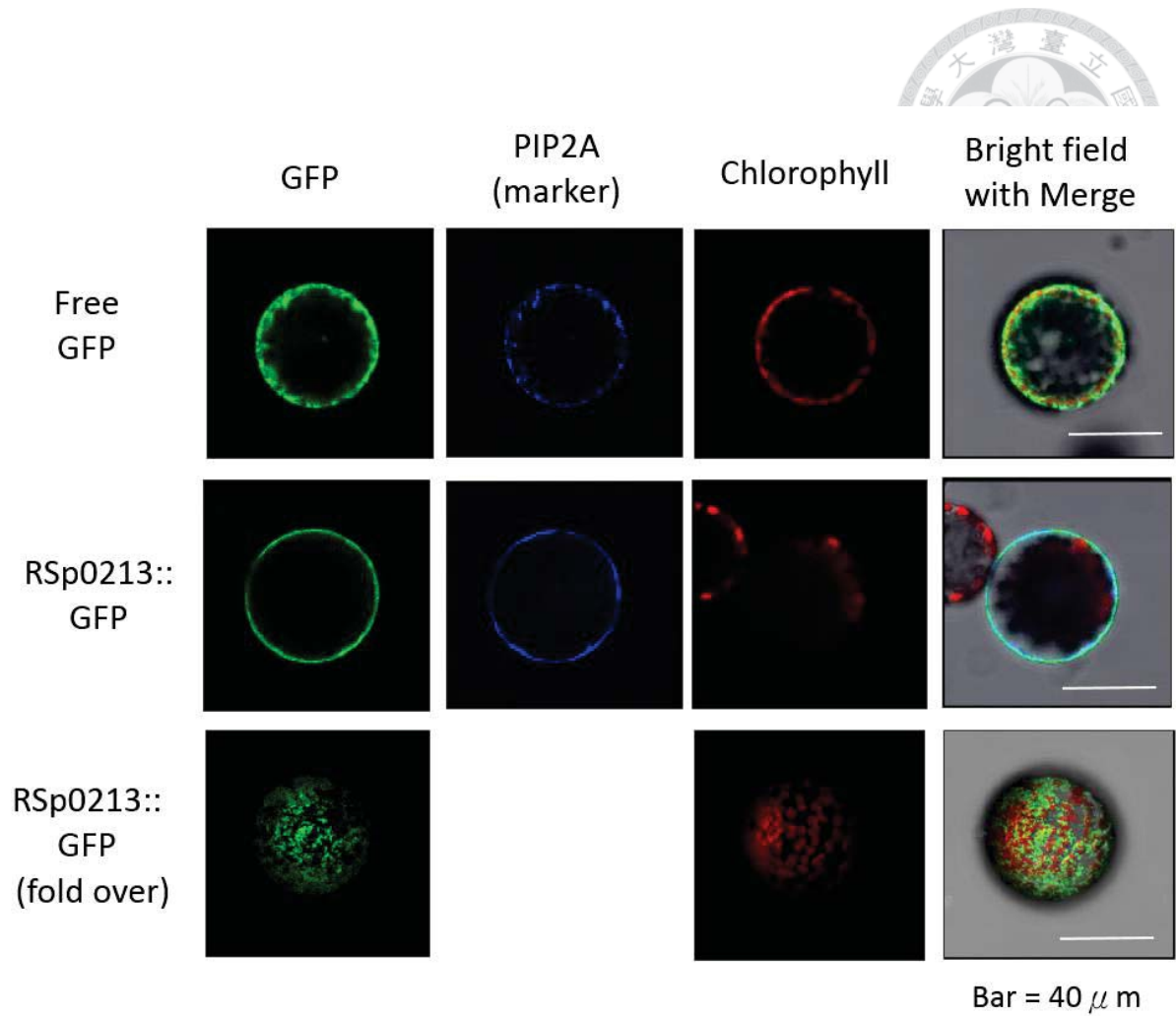
圖一、過量表現 *RSp0213* 或 *RSc3174* 之高毒力青枯病菌 *Pss190* 在抗病品系番茄上之毒力測試。

將大量表現 *RSp0213* 或 *RSc3174* 之高毒力 *Pss190* 菌株 ($O.D.600=0.003$) 直接澆灌於 28-32 天大之抗病品系番茄 H7996 土盆中，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 7-15 棵植物；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計三次試驗共 34 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)，以 Student's *t*-test 進行分析，* 表示具顯著差異 ($p<0.05$)，** 表示具極顯著差異 ($p<0.01$)。



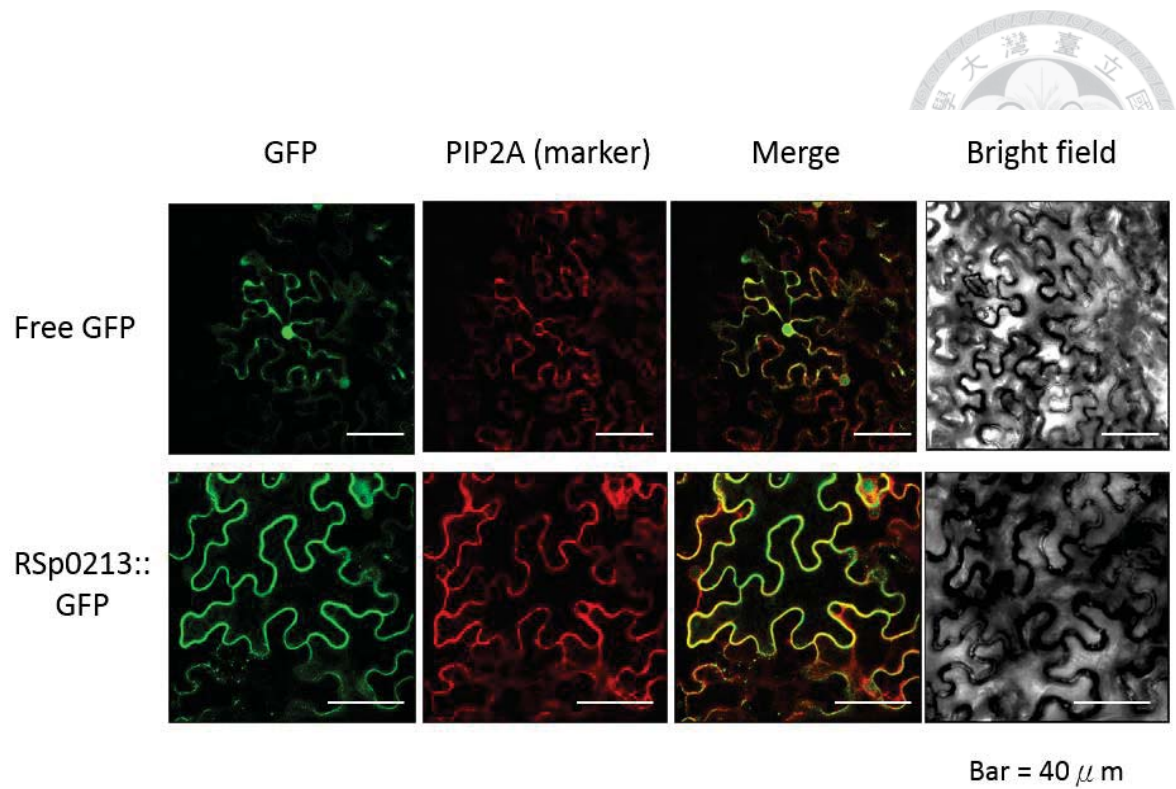
圖二、剔除 *RSp0213* 之中毒力青枯病菌 *Pss4* 在感病品系番茄上之毒力測試。

將剔除 *RSp0213* 之中毒力 *Pss4* 青枯病菌株 (O.D.600=0.003) 直接澆灌於 31-33 天大之感病品系番茄 L390 土盆中，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 14-21 棵植物；本實驗共重複四次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計四次試驗共 63 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)，以 Student's *t*-test 進行分析，**表示具極顯著差異 ($p<0.01$)。



圖三、RSp0213 蛋白在植物細胞中之分佈位置。

利用表現載體 p2GWF7.0，將 RSp0213::GFP 表現於 *Nicotiana benthamiana* 之葉部原生質體 (protoplast) 後，在白光或激發光源下的影像。其中 fold over 為顯微鏡影像進行疊圖處理後之結果。PIP2A::mcherry 為 membrane marker。本實驗至少重複三次，獲得一致結果。



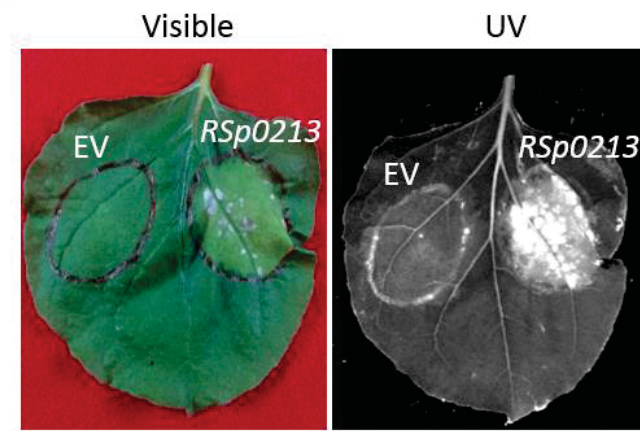
圖四、RSp0213 蛋白於植物體中之分佈位置。

利用表現載體 pMDC83，以農桿菌輔助注射法將 RSp0213::GFP 表現於 *N. benthamiana* 葉部後，在白光或激發光源下的影像。PIP2A::mcherry 為 membrane marker。本實驗共重複兩次，獲得一致結果。



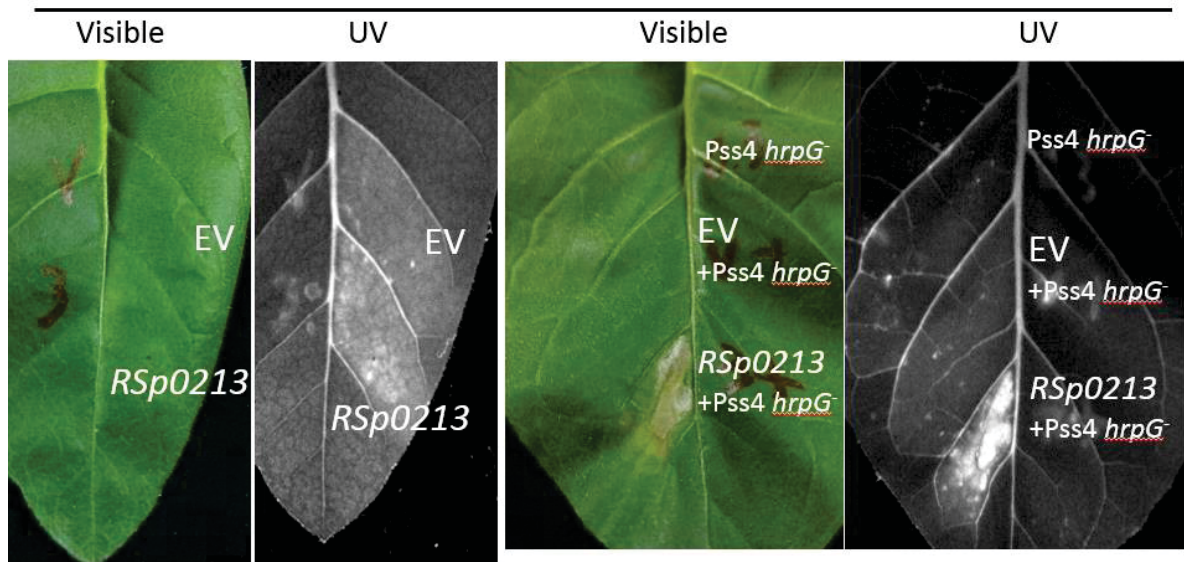
(A)

Nicotiana benthamiana



(B)

Nicotiana tabacum



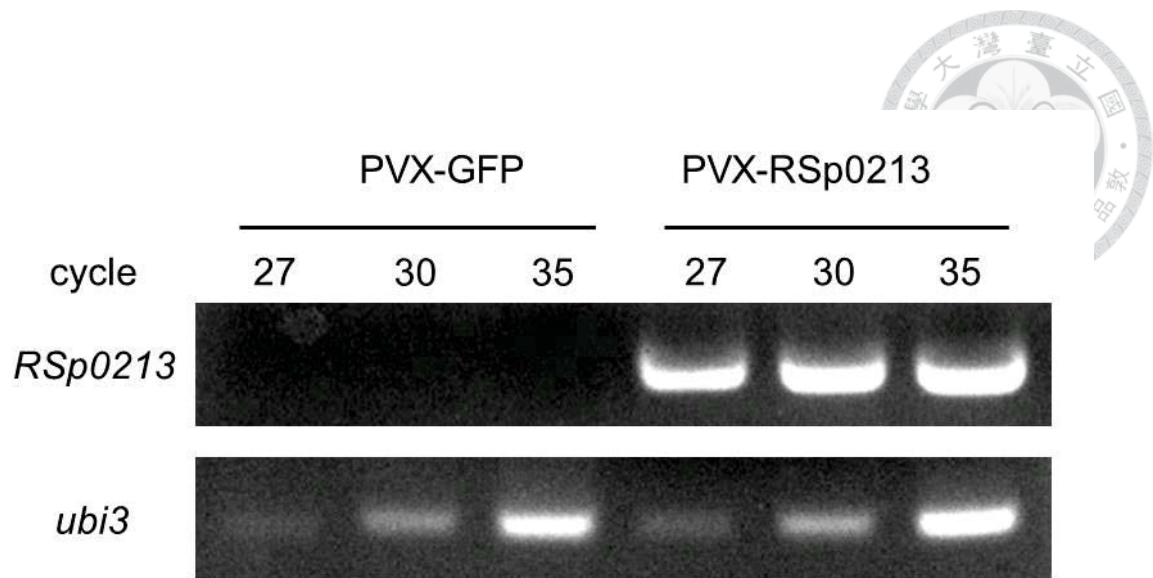
圖五、在菸草短暫表現 *RSp0213* 後之細胞死亡 (programmed cell death)。

以表現載體 pCAMBIA1300，利用農桿菌輔助注射法將 35S::*RSp0213* 表現在

(A) 感病品系 *N. benthamiana* 葉部，於注射農桿菌 96 小時後觀察 PCD 反應。

(B) *N. tabacum* W38 葉部，於注射農桿菌後，再注射青枯病菌突變株 *Pss4 hrpG*⁻ (O.D.600=0.3)，於 96 小時後觀察細胞死亡情形。

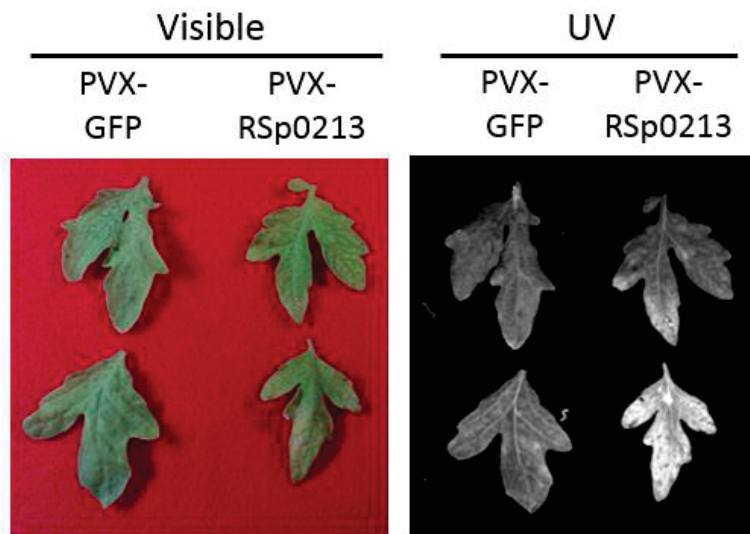
本實驗至少重複三次，實驗結果趨勢一致。



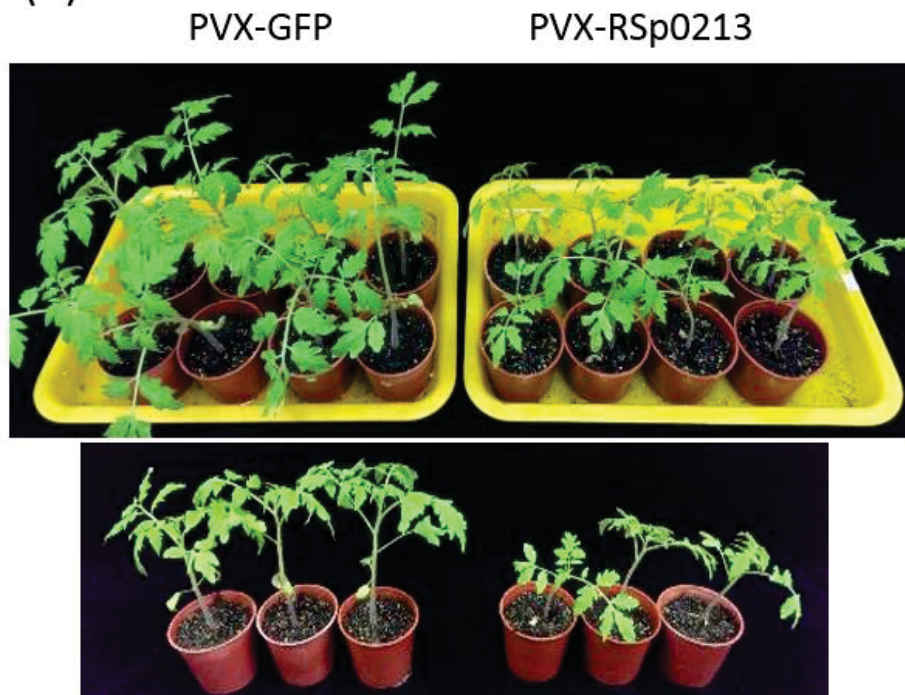
圖六、在番茄短暫表現 *RSp0213* 之效率檢測。

以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體在番茄系統性表現 35S::*RSp0213*，以 12-18 天大之抗病品系番茄 H7996 子葉用 2 μ L 微量吸管尖 (tip) 於葉脈中間製造小傷口，用 1 mL 針筒將菌液注滿子葉，置於 21°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱，14 天後取植物葉部以半定量實驗檢測 *RSp0213* 基因表現；*ubi3* 作為實驗之內控制組 (internal control)；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致。

(A)



(B)



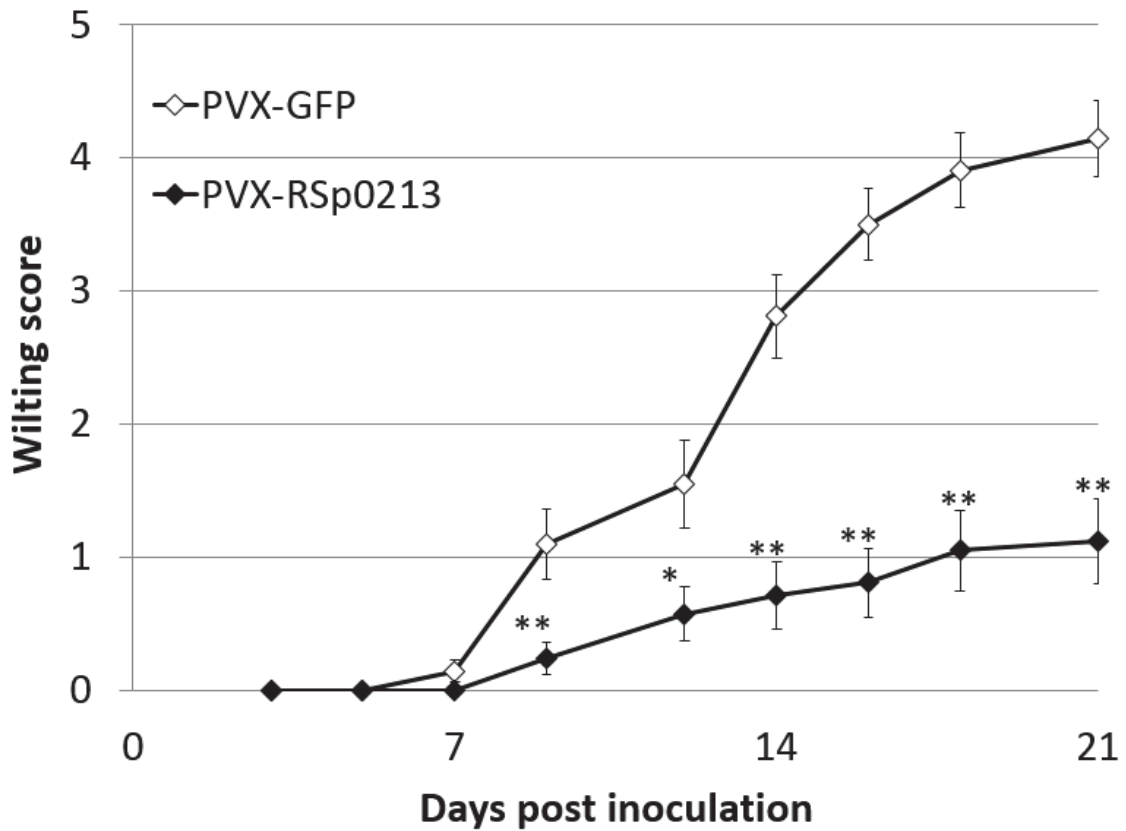
圖七、在番茄短暫表現 *RSp0213* 之細胞死亡與植株生長型態。

以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體在番茄系統性表現 35S::*RSp0213*，以 12-18 天大之抗病品系番茄 H7996 子葉用 2 μ L 微量吸管尖 (tip) 於葉脈中間製造小傷口，用 1 mL 針筒將菌液注滿子葉，置於 21°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱，14 天後觀察並記錄

(A) 番茄葉部於可見光 (visible) 及紫外光 (UV) 下觀察細胞死亡。

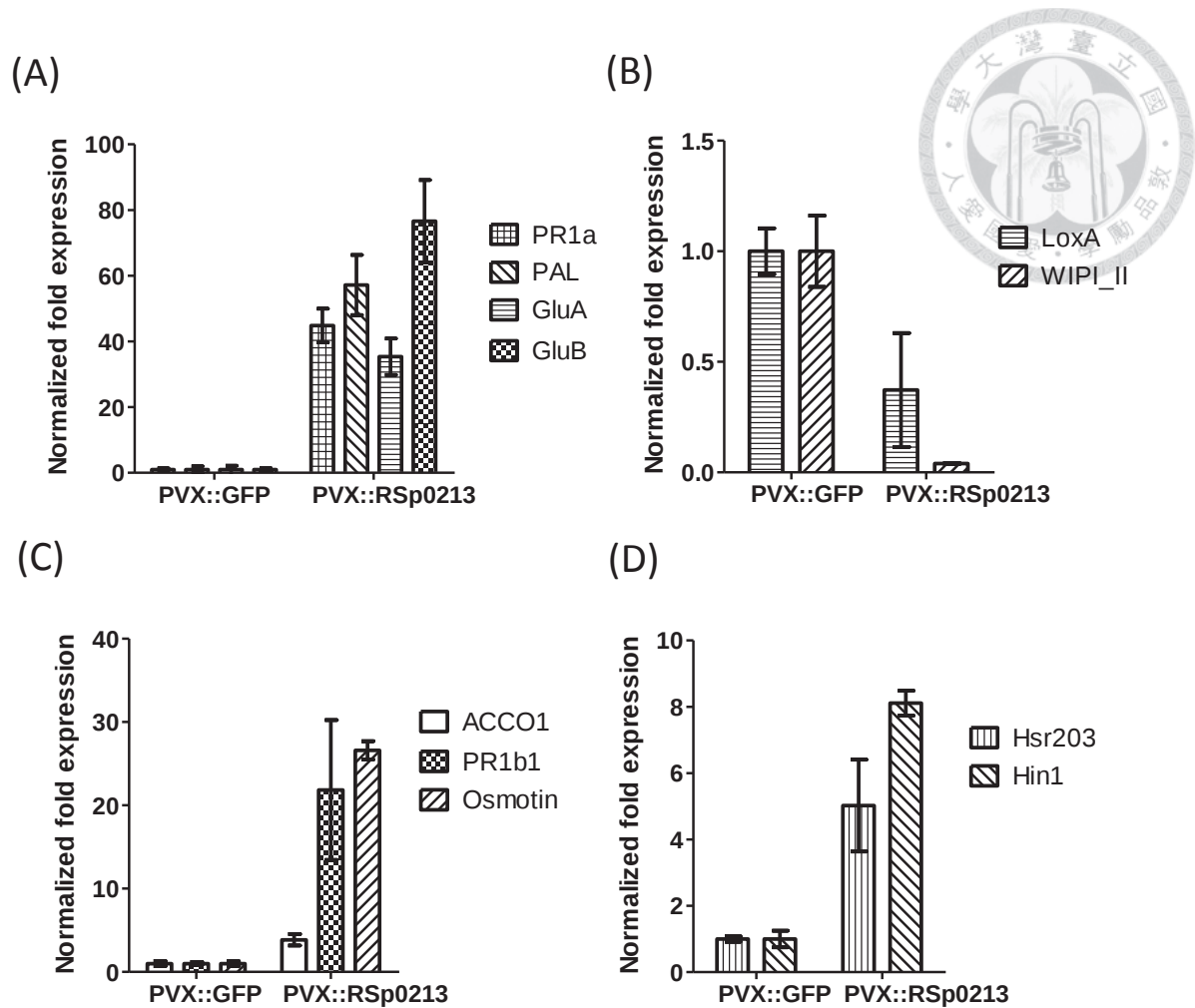
(B) 短暫表現 *RSp0213* 後之植株生長型態差異。

本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致。



圖八、在番茄表現 *RSp0213* 對病害反應之影響。

以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體，在 17-18 天大之抗病品系番茄 H7996 系統性表現 35S::*RSp0213*，14 天後直接於土盆澆灌高毒力青枯病菌株 Pss190 (O.D.600=0.03)，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 14 棵植物；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計三次試驗共 42 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)，以 Student's *t*-test 進行分析，*表示具顯著差異 ($p<0.05$)，**表示具極顯著差異 ($p<0.01$)。



圖九、在番茄表現 *RSp0213* 對防禦反應相關標誌基因表現之影響。

以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體在番茄系統性表現 35S::*RSp0213*，以 12-18 天大之抗病品系番茄 H7996 子葉用 2 μ L 微量吸管尖 (tip) 於葉脈中間製造小傷口，用 1 mL 針筒將菌液注滿子葉，置於 21°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱，14 天後抽取植株葉部之 RNA，以 RT-qPCR 進行基因檢測

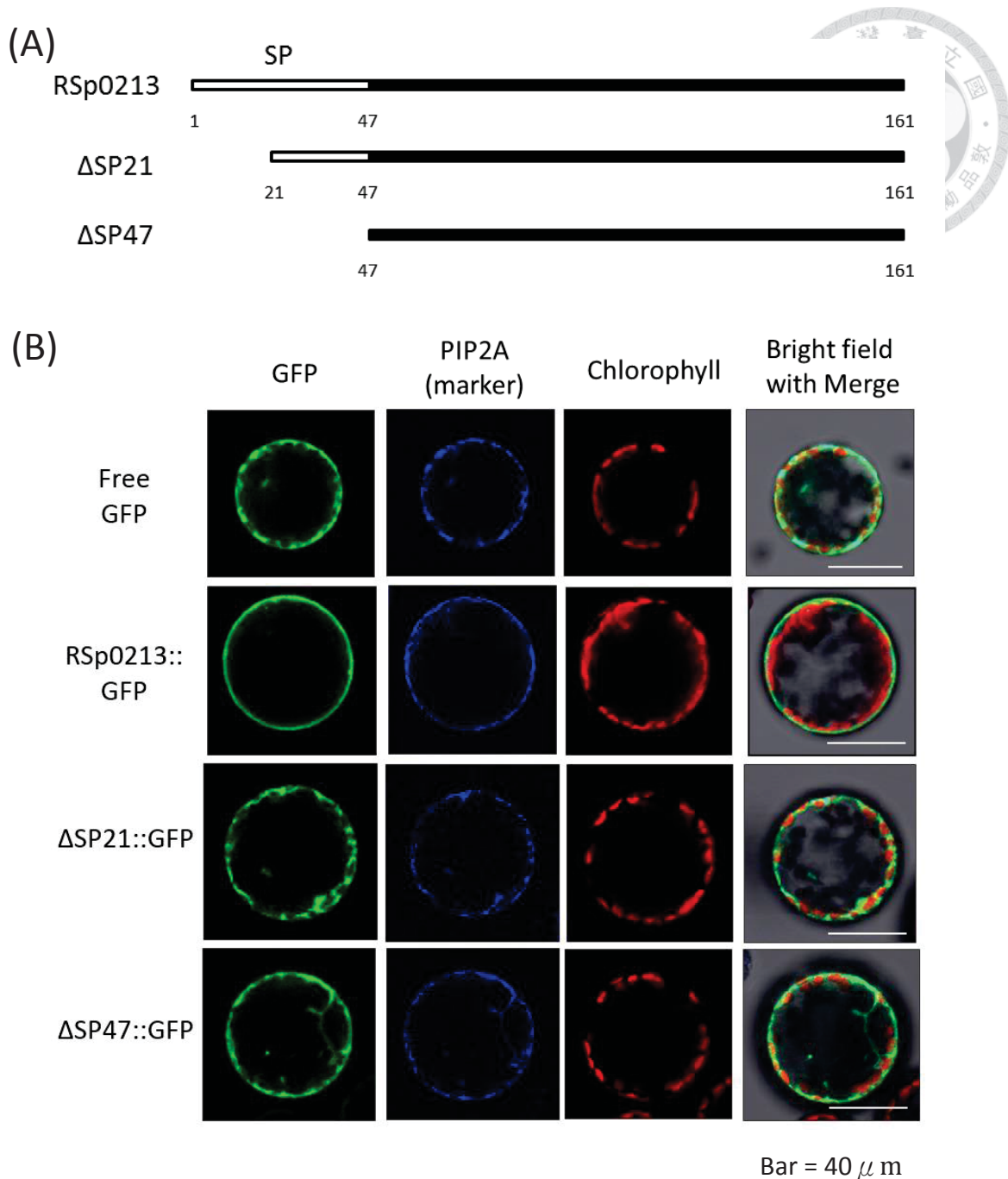
(A) 水楊酸相關標誌基因。

(B) 茉莉酸相關標誌基因。

(C) 乙烯相關標誌基因。

(D) 細胞死亡訊息傳導相關標誌基因。

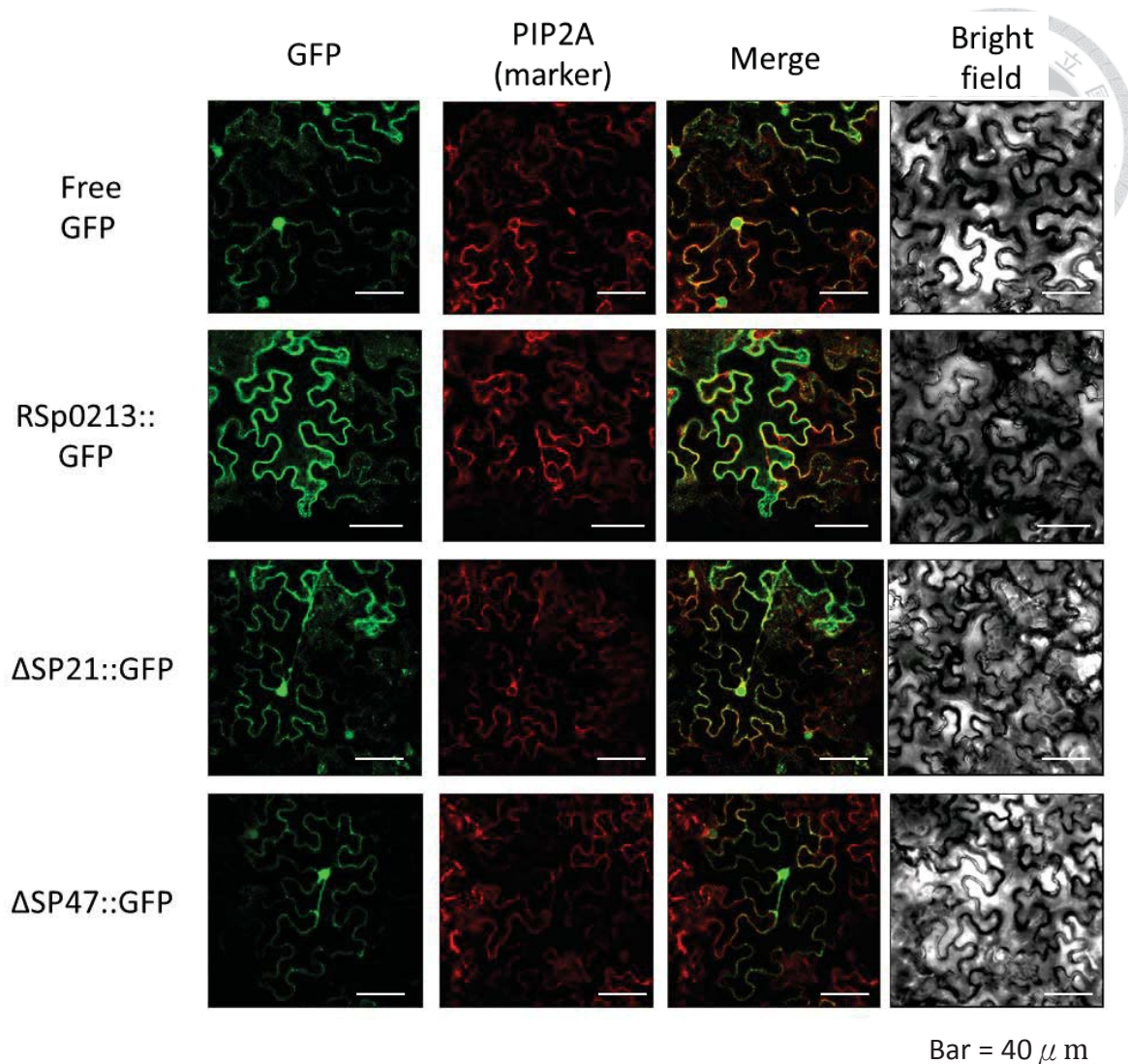
Y 軸表示基因的相對表現量；本實驗共重複兩次，實驗結果趨勢一致，在此呈現具代表性的一次結果。垂直線距表示標準差 (standard deviation, SD)。



圖十、分析決定 RSp0213 在植物細胞中之座落位置的重要區段。

(A) 各式 RSp0213::GFP 片段蛋白之長度示意圖。最上方為 RSp0213 之蛋白質全長以及生物資訊分析所預測之訊息胜肽 (signal peptide, SP) 示意圖。

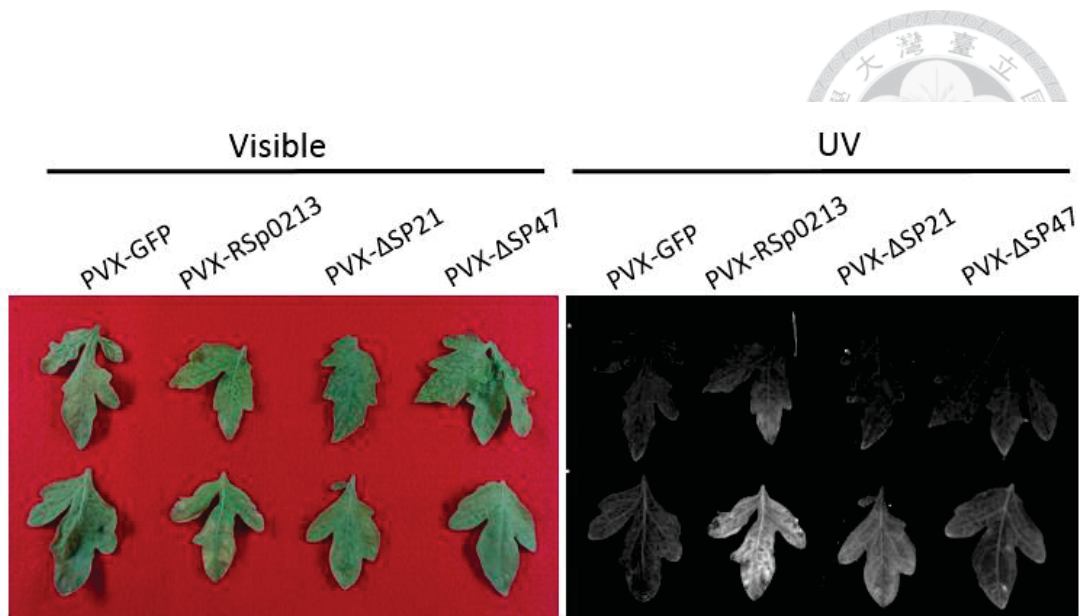
(B) 利用表現載體 p2GWF7.0，表現圖 (A) 中各式 RSp0213::GFP 片段刪除蛋白於 *N. benthamiana* 之葉部原生質體後，在激發光源下或白光下之影像。PIP2A::mcherry 為 membrane marker。本實驗至少重複兩次，獲一致結果。



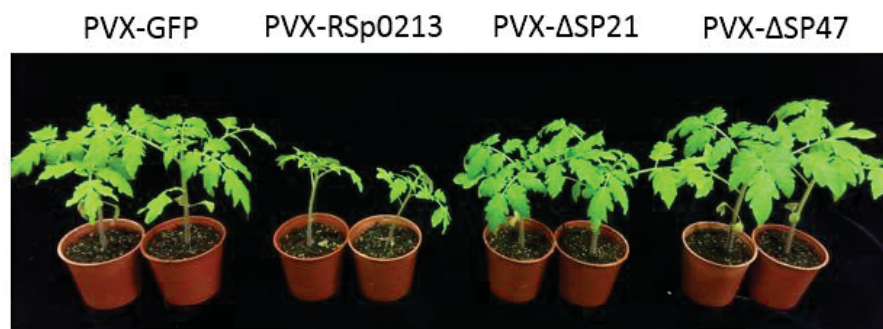
圖十一、分析決定 RSp0213 於植物體中之座落位置的重要區段。

利用表現載體 pMDC83，以農桿菌輔助注射法將各式 RSp0213::GFP 片段刪除蛋白表現於 *N. benthamiana* 葉部後，在白光或激發光源下的影像。PIP2A::mcherry 為 membrane marker。本實驗至少重複兩次，獲得一致結果。

(A)



(B)



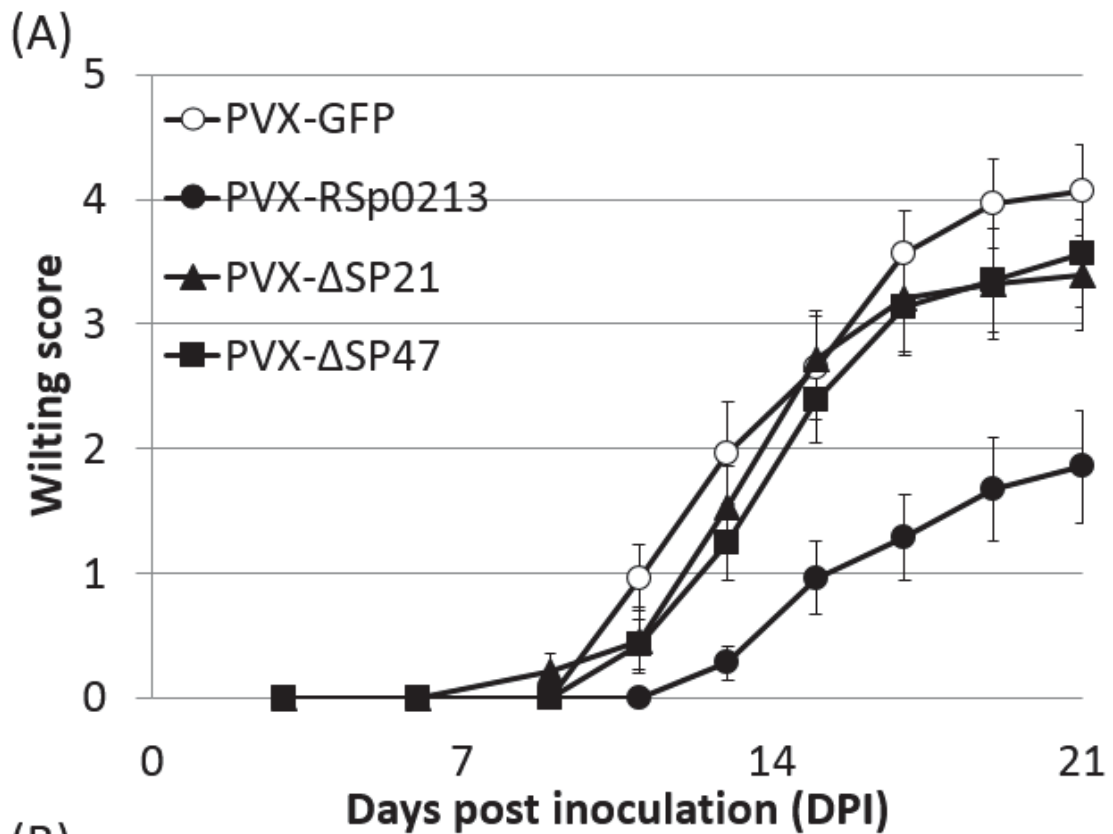
圖十二、在番茄短暫表現片段刪除之 *RSp0213* 之細胞死亡與植株生長型態。

以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體在番茄系統性表現片段刪除之 *RSp0213*，以 12-18 天大之抗病品系番茄 H7996 子葉用 2 μ L 微量吸管尖 (tip) 於葉脈中間製造小傷口，用 1 mL 針筒將菌液注滿子葉，置於 21°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱，14 天後觀察並記錄

(A) 番茄葉部於可見光 (visible) 及紫外光 (UV) 下觀察細胞死亡。

(B) 短暫表現 *RSp0213* 後之植株生長型態差異。

本實驗共重複兩次，實驗結果趨勢一致。



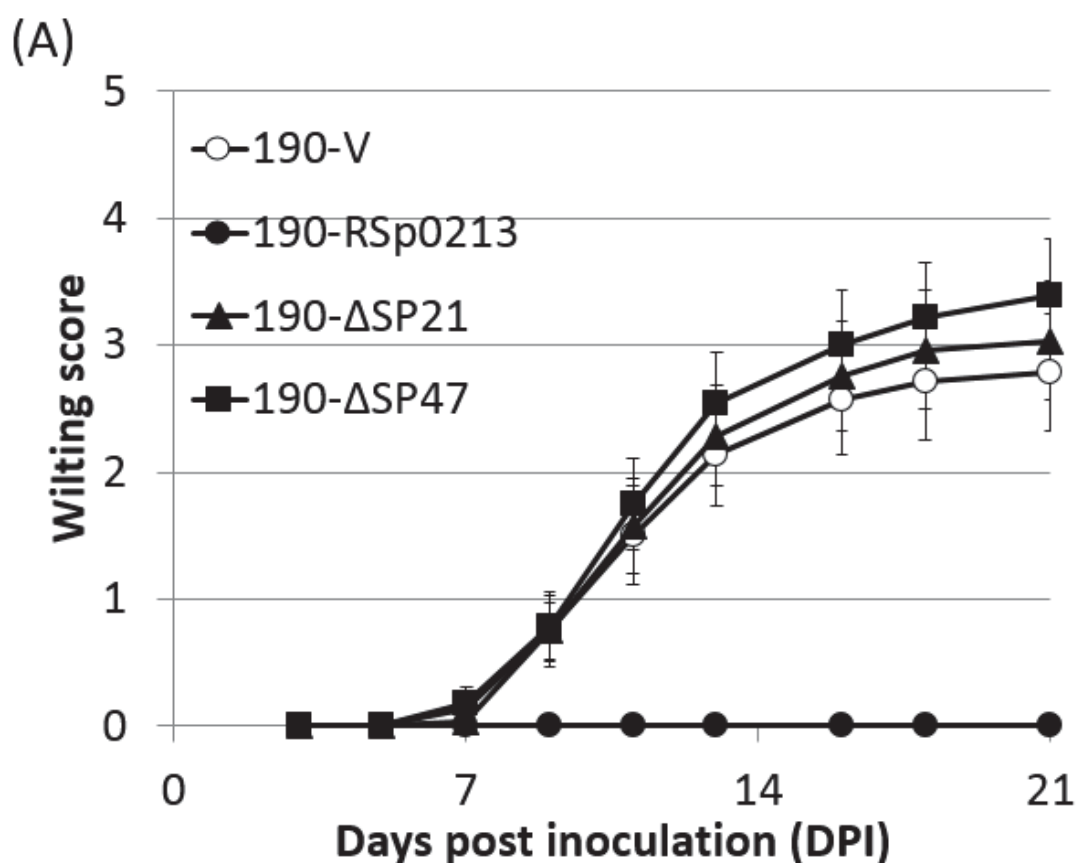
(B)

Sample/DPI	6	9	11	13	15	17	19	21
ΔSP21	ns	ns	ns	**	**	**	**	*
ΔSP47	ns	ns	*	**	**	**	**	**

圖十三、在番茄表現片段刪除之 *RSp0213* 對病害反應之影響。

(A) 以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體，在 17-18 天大之抗病品系番茄 H7996 系統性表現片段刪除之 *RSp0213*，14 天後直接於土盆澆灌高毒力青枯病菌株 Pss190 (O.D.600=0.03)，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 14 棵植物；本實驗共重複兩次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計兩次試驗共 28 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)。

(B) 與表現全長序列之 *RSp0213* 相比較，以 Student's *t*-test 進行分析，ns 表示無顯著差異 ($p>0.05$)，* 表示具顯著差異 ($p<0.05$)，** 表示具極顯著差異 ($p<0.01$)。



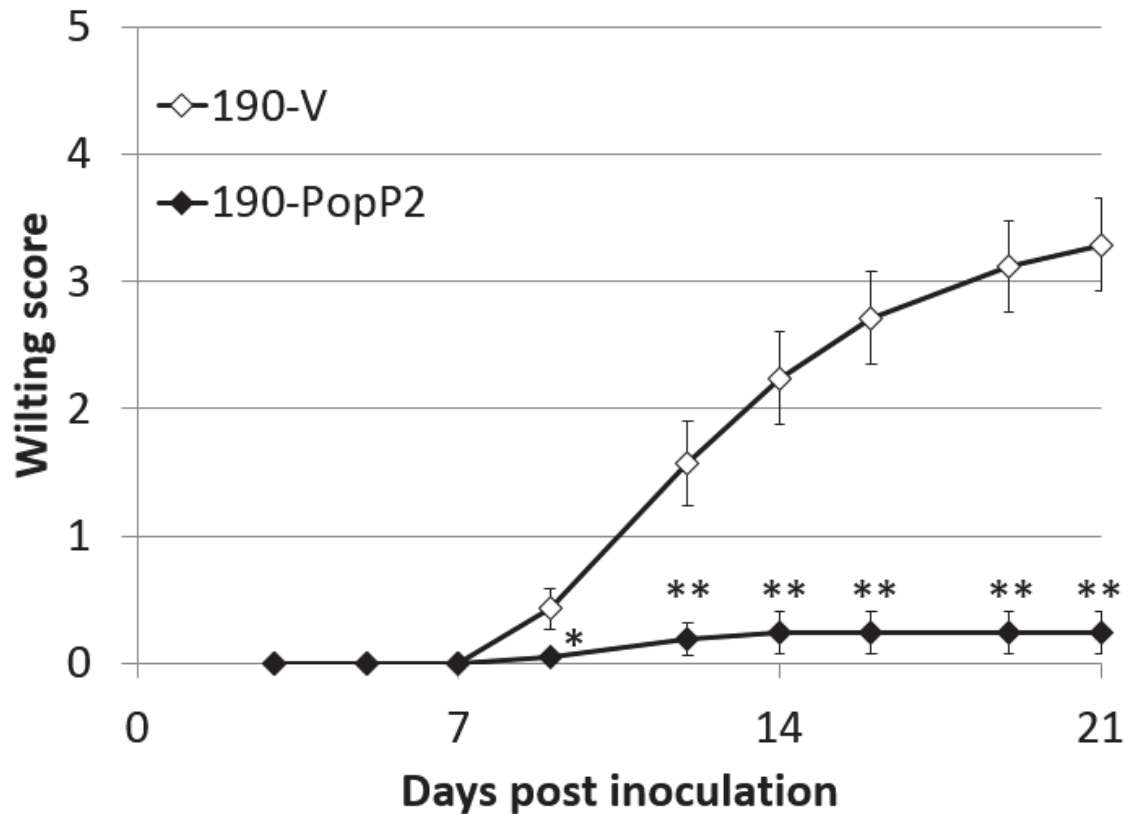
(B)

Sample/DPI	5	7	9	11	13	16	18	21
ΔSP21	ns	ns	**	**	**	**	**	**
ΔSP47	ns	ns	**	**	**	**	**	**

圖十四、過量表現片段刪除之 *RSp0213* 之高毒力青枯病菌 *Pss190* 在抗病品系番茄上之毒力測試。

(A) 將大量表現片段刪除之 *RSp0213* 之高毒力 *Pss190* 菌株 ($O.D.600=0.003$) 直接澆灌於 28-32 天大之抗病品系番茄 H7996 土盆中，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 14 棵植物；本實驗共重複兩次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計兩次試驗共 28 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)。

(B) 與表現全長序列之 *RSp0213* 相比較，以 Student's *t*-test 進行分析，ns 表示無顯著差異 ($p>0.05$)，** 表示具極顯著差異 ($p<0.01$)。

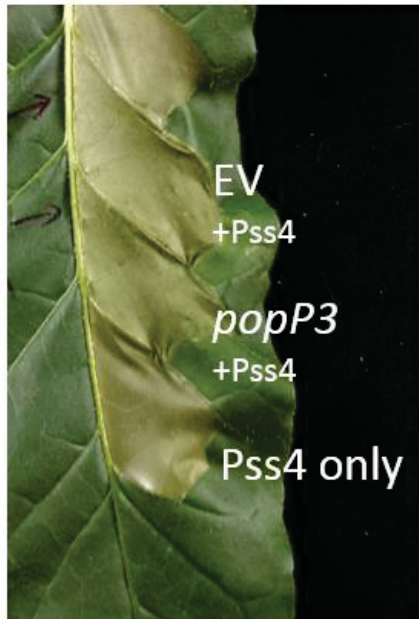


圖十五、過量表現 *popP2* 之高毒力青枯病菌 Pss190 在抗病品系番茄上之毒力測試。

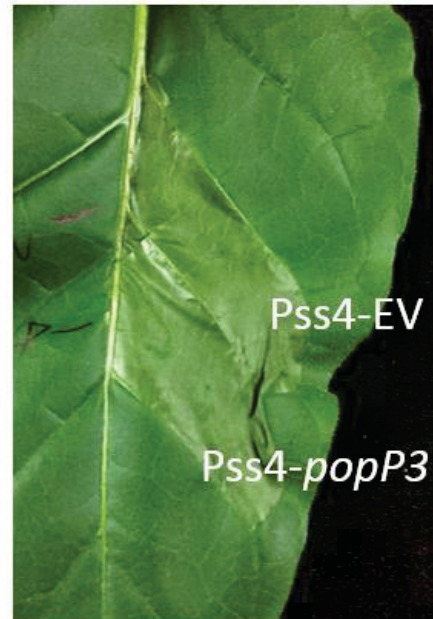
將大量表現 *popP2* 之高毒力 Pss190 菌株 (O.D.600=0.003) 直接澆灌於 28-32 天大之抗病品系番茄 H7996 土盆中，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 14 棵植物；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計三次試驗共 42 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)，以 Student's *t*-test 進行分析，*表示具顯著差異 ($p<0.05$)，**表示具極顯著差異 ($p<0.01$)。



(A)



(B)



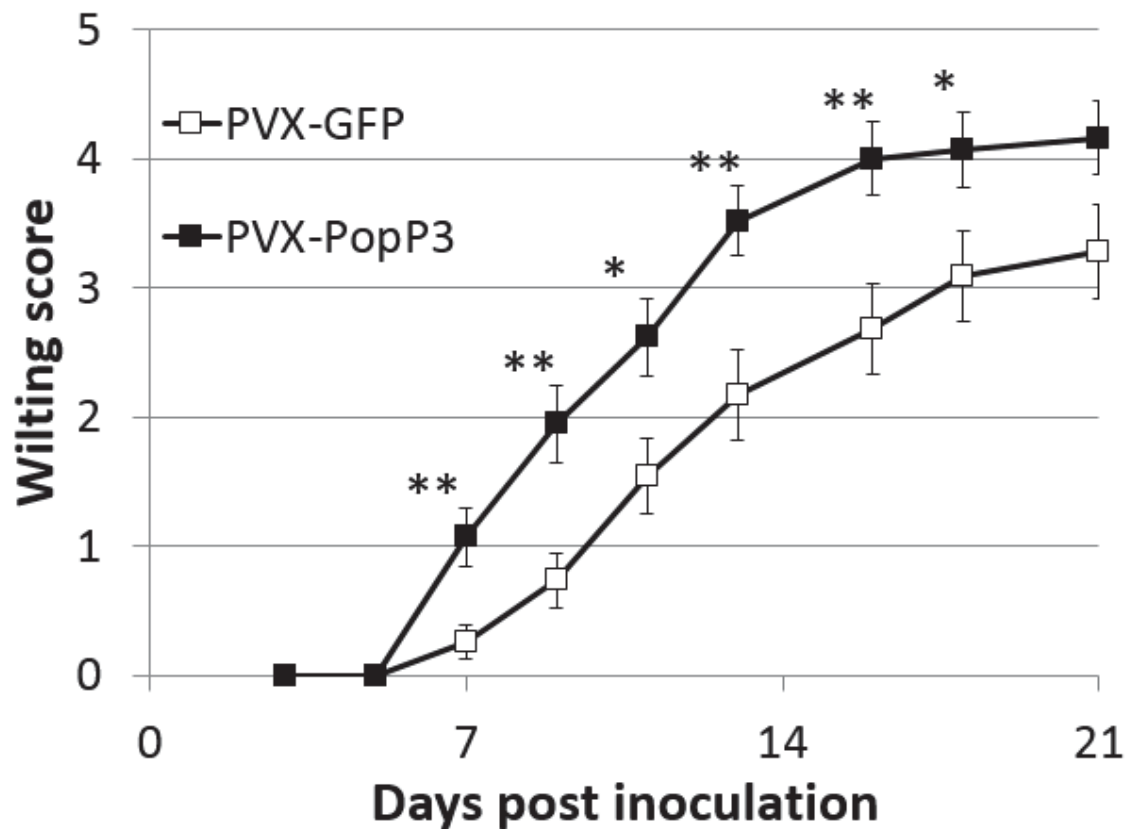
圖十六、*popP3* 對病菌誘導之植物過敏反應的抑制能力測試。

在 *N. tabacum* W38 葉部，以

(A) 表現載體 pCAMBIA1300，利用農桿菌輔助注射法使 35S::*popP3* 表現，於注射農桿菌 48 小時後，再注射中毒力青枯病菌 Pss4 菌液 (O.D.600=0.3)，於 48 小時後觀察過敏反應。

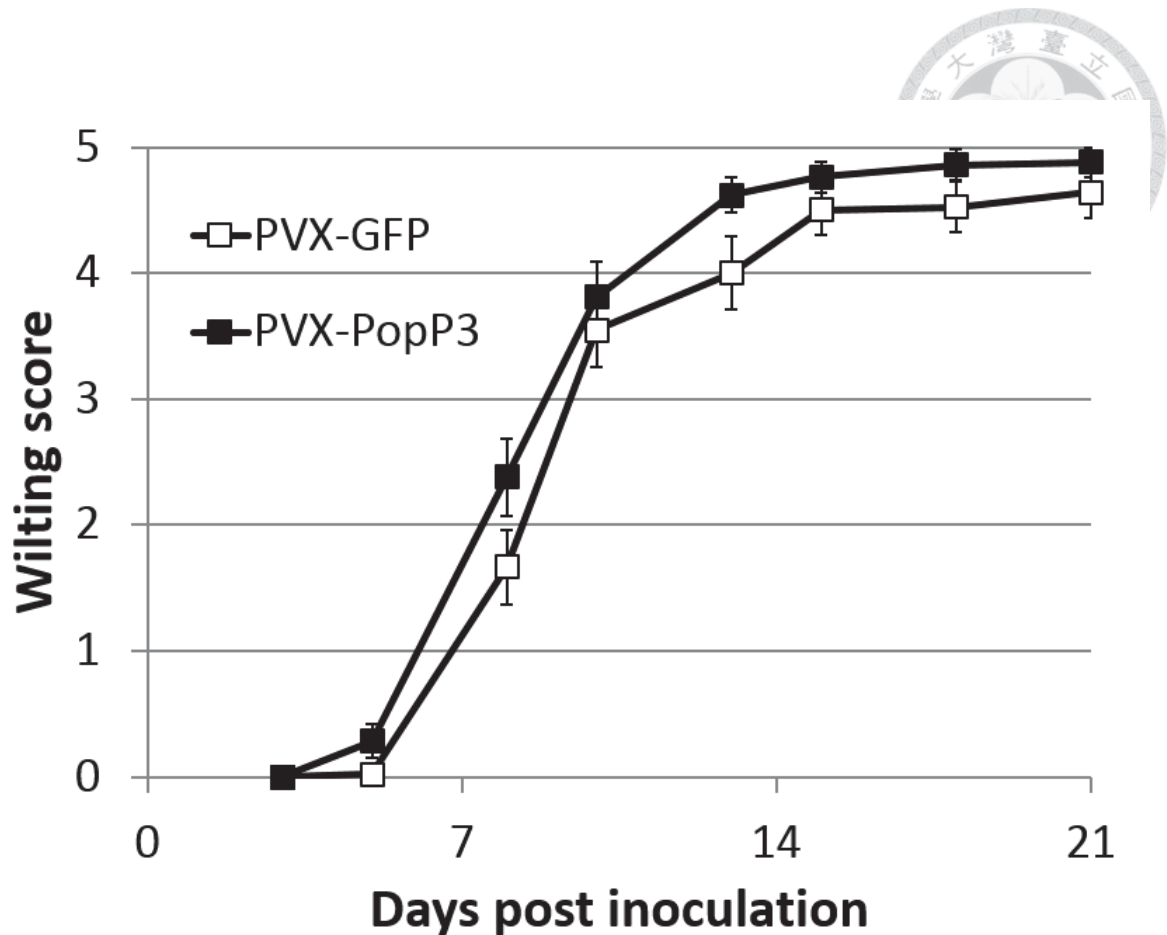
(B) 大量表現 *popP3* 之中毒力 Pss4 菌株 (O.D.600=0.3) 注射於葉部，於 24 小時後觀察過敏反應。

本實驗至少重複三次，實驗結果趨勢一致。



圖十七、在番茄表現 *popP3* 對接種中毒力青枯病菌 Pss4 之病害反應的影響。

以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體在番茄系統性表現 35S::*popP3*，以 17-18 天大之感病品系番茄 L390 子葉用 2 μ L 微量吸管尖 (tip) 於葉脈中間製造小傷口，用 1 mL 針筒將菌液注滿子葉，置於 21°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱，14 天後直接於土盆澆灌中毒力青枯病菌株 Pss4 (O.D.600=0.03)，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 14 棵植物；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計三次試驗共 42 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)，以 Student's *t*-test 進行分析，* 表示具顯著差異 ($p < 0.05$)，** 表示具極顯著差異 ($p < 0.01$)。



圖十八、在番茄表現 *popP3* 對接種高毒力青枯病菌 Pss190 之病害反應的影響。

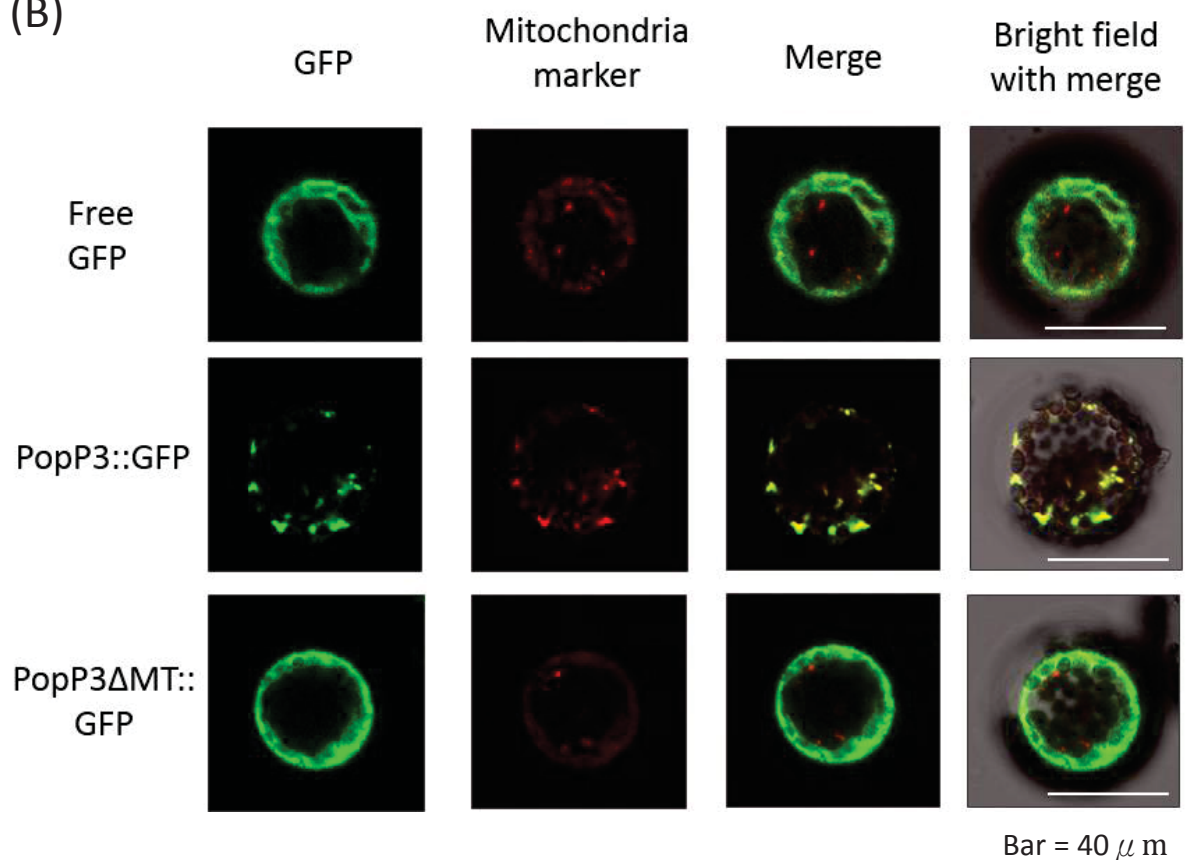
以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體在番茄系統性表現 35S::*popP3*，以 17-18 天大之抗病品系番茄 H7996 子葉用 2 μ L 微量吸管尖 (tip) 於葉脈中間製造小傷口，用 1 mL 針筒將菌液注滿子葉，置於 21°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱，14 天後直接於土盆澆灌高毒力青枯病菌株 Pss190 (O.D.600=0.03)，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 14 棵植物；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計三次試驗共 42 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)，以 Student's *t*-test 進行分析。

(A)

↓

1	MPEKA	LCQRH	TPVRT	SCHCF	APDAS	KGKWR	DENQN	PLLEV	INMGV	CFSKS
51	SNSVI	DRHYA	SDAEH	SVHST	ERSCA	ESRTT	SPPRS	PSGQL	SDLSC	KSPAW
101	RGNQP	PRRAL	LGDLA	AIRSS	LEGIQ	DMKAV	PDSSV	LDLDA	ALLPV	TARSE
151	NIRSA	DKCRN	AEAYH	FPLHH	FPHLQ	AFCAA	IADDT	LQDGR	AIFRL	RADHD
201	HVUSA	DVRTV	GPAVS	ILILE	PVDQF	SVRRL	LESCL	EEMAG	LLPSN	AAVSV
251	LIHDS	QKSKF	DCAIF	ALHAA	SKMVD	ERRFL	DALHA	EHASP	HGPGY	ASRLA
301	HLRHT	QVGPF	RIVDA	HTILP	PAFYK	HGQSR	KAIEK	AFANR	GGAQY	ATVVK
351	QGQTL	LGRFE	DKRDF	RLDLN	ATVST	SIEDK	RIAYL	ARARD	YLQTA	PEDEV
401	HDTVA	AVADT	APDWF	RKSRA	AIDTD	TDS				

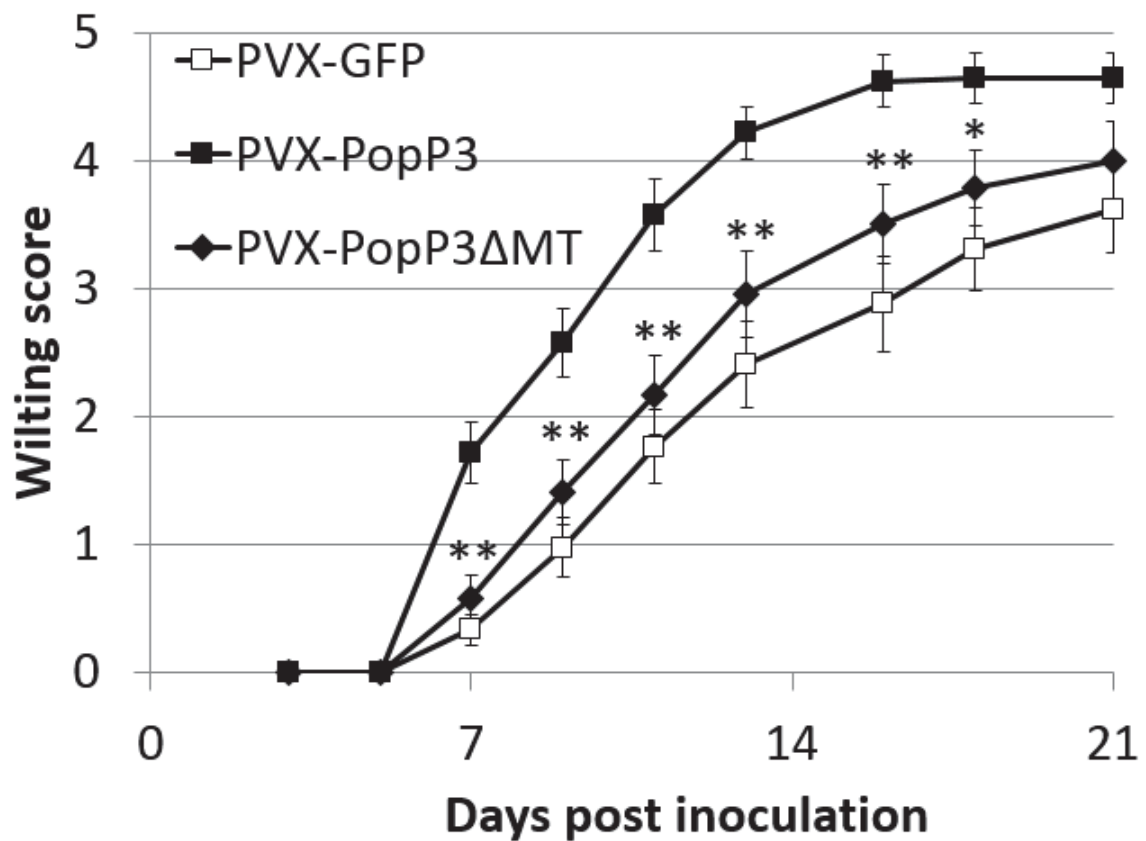
(B)



圖十九、分析決定 PopP3 在植物細胞中之座落位置的重要區段。

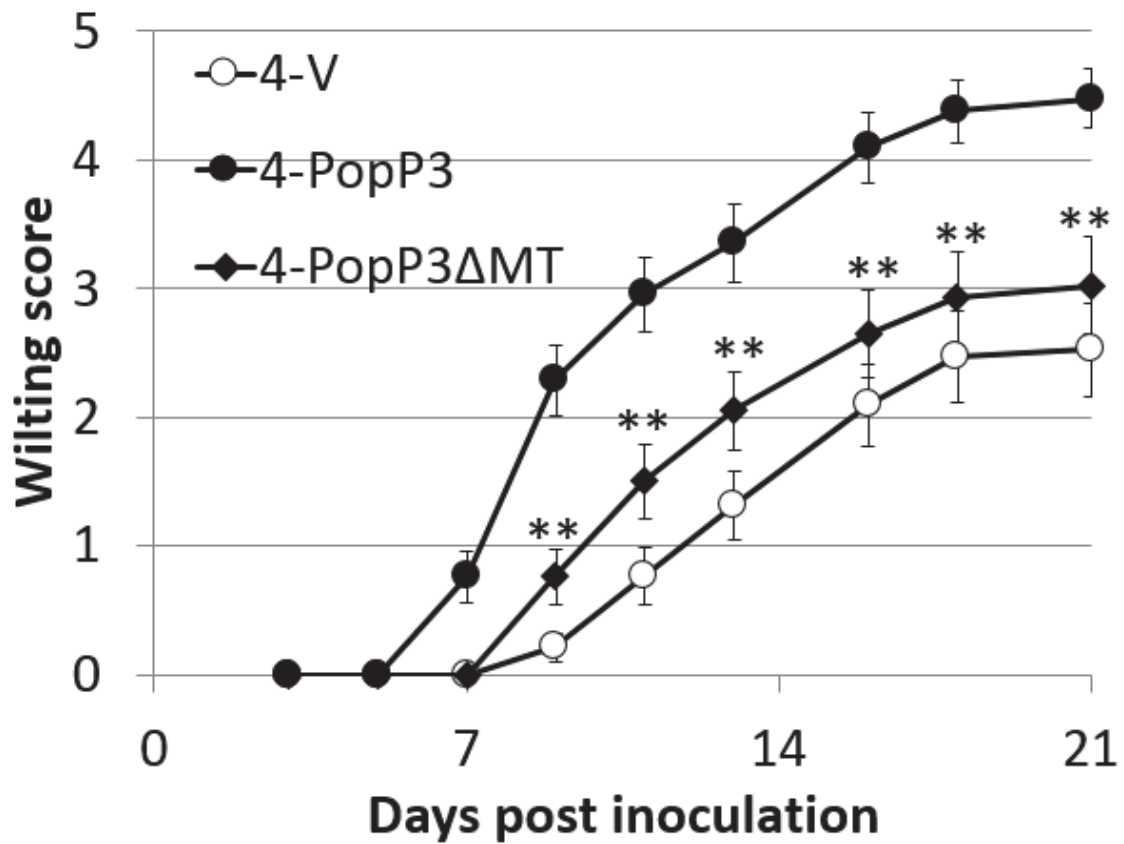
(A) PopP3 胺基酸序列。黑框部份標示為生物資訊分析所預測之粒線體訊息胜肽 (mitochondria targeting peptide, MT)，箭頭所指位置為 PopP3 進入粒線體後預測切除胜肽的位置 (mitochondria cleavage site)。

(B) 利用表現載體 p2GWF7.0，表現各式 PopP3::GFP 片段刪除蛋白於 *N. benthamiana* 之葉部原生質體後，在激發光源下或白光下之影像。mitochondria marker 為 ScCOX4::RFP。本實驗至少重複兩次，獲一致結果。



圖二十、在番茄表現片段刪除之 *popP3* 對病害反應之影響。

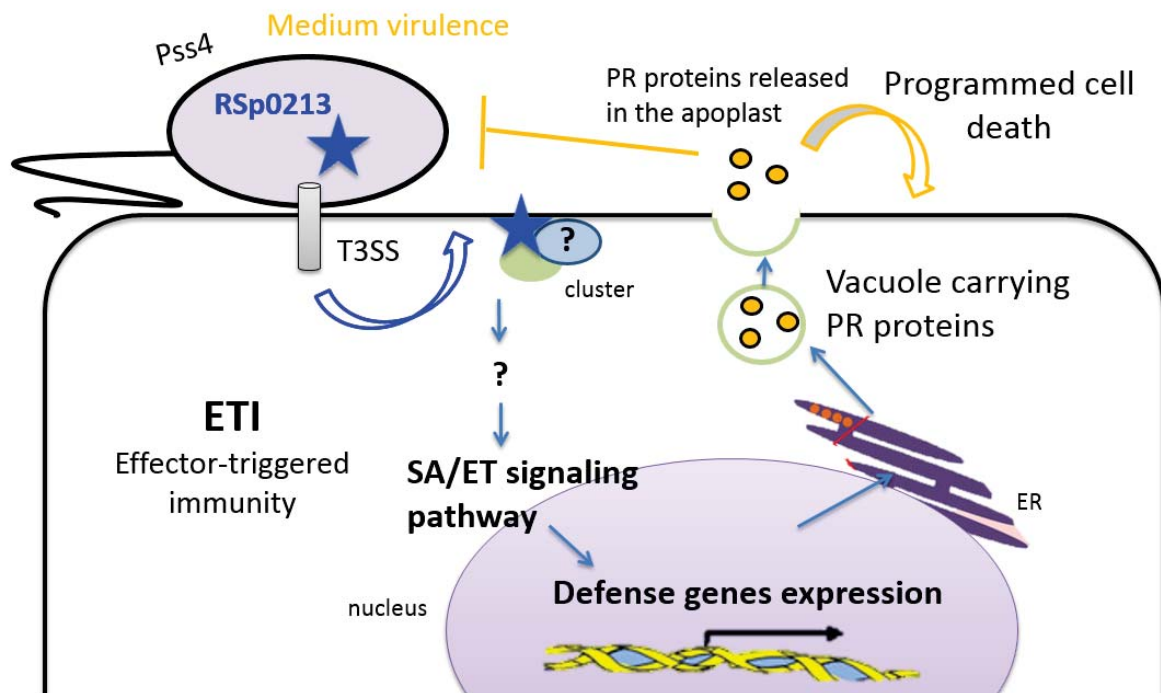
以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體在番茄系統性表現片段刪除之 *popP3*，以 17-18 天大之感病品系番茄 L390 子葉用 2 μ L 微量吸管尖 (tip) 於葉脈中間製造小傷口，用 1 mL 針筒將菌液注滿子葉，置於 21°C，12 小時光照，12 小時黑暗的植物生長箱，14 天後直接於土盆澆灌中毒力青枯病菌株 Pss4 (O.D.600=0.03)，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 14 棵植物；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計三次試驗共 42 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)，與表現全長序列之 *popP3* 相比較，以 Student's *t*-test 進行分析，*表示具顯著差異 ($p<0.05$)，**表示具極顯著差異 ($p<0.01$)。



圖二十一、過量表現片段刪除之 *popP3* 之中毒力青枯病菌 Pss4 在感病品系番茄上之毒力測試。

將大量表現片段刪除之 *popP3* 之中毒力 Pss4 菌株 (O.D.600=0.03) 直接澆灌於 31-33 天大之感病品系番茄 L390 土盆中，定期紀錄植株發病情形。每次實驗使用 14 棵植物；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計三次試驗共 42 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)，與表現全長序列之 *popP3* 相比較，以 Student's *t*-test 進行分析，**表示具極顯著差異 ($p<0.01$)。

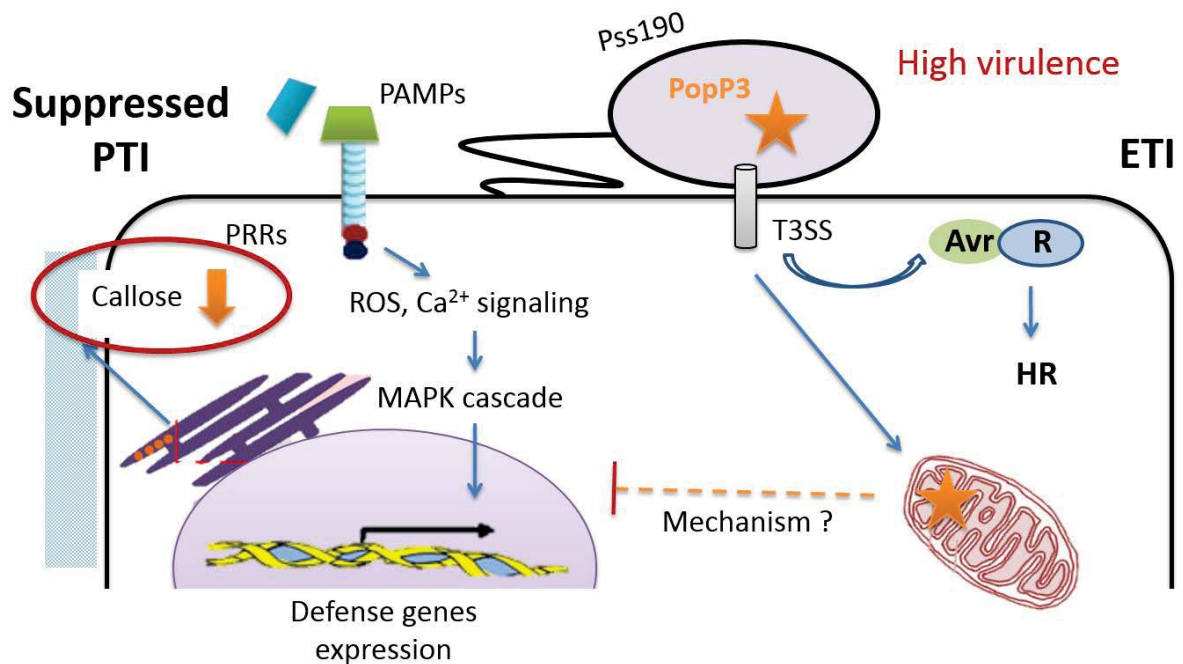
Summary and Hypothesis



圖二十二、RSp0213 引發植物防禦反應之可能路徑。

存於中/低毒力青枯病菌之 RSp0213 可能藉由 T3SS 調控並送入植物細胞，於細胞膜上形成蛋白質集群 (protein cluster)，可能負責攻擊植物細胞膜之相關功能。而 *N. benthamiana*、*N. tabacum* 及番茄等茄科植物則已演化出可辨認 RSp0213 之相對應作用蛋白，於感染區引發 PCD 反應，並活化防禦賀爾蒙 SA 與 ET 之系統性訊息傳導路徑，誘發系統性免疫反應，以降低病原菌在植物體的致病能力。

Summary and Hypothesis



圖二十三、PopP3 干擾植物免疫反應之可能路徑。

存在於高毒力青枯病菌菌株 Pss190 之 PopP3，可能藉由 T3SS 調控並送入植物細胞，移至粒線體並干擾其特定功能，進而抑制宿主之某些 PTI 反應，例如減少癒傷葡聚糖之累積，使植物對青枯病菌與軟腐病細菌更為感病；而 PopP3 作用之訊息傳遞路徑可能位於 ROS 累積機制之下游，故 PopP3 無涉於調控 ROS 與 HR 反應。

附表一、青枯病菌毒力數據^a

Phylotype I strains	Aggressiveness ^b	Tomato wilting (%)		
		H7996 (R) ^c	L180 (MR)	L390 (S)
Pss190	High	91.7	100	100
Pss1308	High	100	100	100
Pss4	Medium	16.7	58.3	100
Pss216	Low	0	8.3	66.7

^a 資料來源：亞洲蔬菜中心王肇芬老師研究團隊。

^b 係指毒力高低程度。

^c 不同抗感病蕃茄品系。R：抗病蕃茄 (resistance)；MR：中抗品系蕃茄 (medium resistance)；S：感病品系蕃茄 (susceptible)

附表二、在高毒力菌株 Pss190 及 Pss1308 遺傳背景下分別表現 *RSc0213* 和 *RSc3174* 之基因轉移表現株與載體 (empty vector) 轉型株在生長及致病相關特性上無顯著差異^a

Characteristics (vs. WT carrying empty vector)	Pss190 / Pss1308	
	pUFR047:: <i>RSp0213</i>	pUFR047:: <i>RSc3174</i>
Growth on media		
TTC	=/= ^b	=/=
TTC+SDS	=/=	=/=
MM	=/=	=/=
SM1	=/=	=/=
Biofilm formation	=/n.d.	=/n.d.
Swimming Motility	=/=	=/=
Root attachment	↓/=	↓/=
HR response	=/=	=/=
Multiplication in planta	=/=	=/=

^a 資料來源：(李千惠, 2009)。

^b ↑，表基因轉移株展現較佳之能力；↓，表基因轉移株展現較差之能力；=，表基因轉移株與載體轉型株沒有明顯差異；n.d, 未測試。可定量之實驗以 student's t-test 分析是否有顯著差異，而無法定量者以肉眼觀察加以判斷。菌株於培養基上之生長共觀察 4 天。

附表三、本研究團隊定序之青枯病菌菌株特性 ^a

Strain	Host	Race	Biovar	Phylotype	Virulence
Pss190	Tomato	1	4	I	high
Pss1308	Tomato	1	3	I	high
Pss4	Tomato	1	3	I	medium
Pss216	Tomato	1	3	I	low

^a 與台南亞洲蔬菜中心王肇芬老師與英國 Exeter 大學 Murray Grant 教授研究團隊合作定序。

附表四、本研究使用之質體與菌株特性

Strains or plasmids	Description	Source or reference
Plasmids		
pUFR047	Low copy number and broad host range cloning vector pUFR047, Amp ^r , Gm ^r	李千惠, 2009
pUFR047-RSp0213	Low copy number and broad host range cloning vector pUFR047 containing RSp0213, Amp ^r , Gm ^r	李千惠, 2009
pUFR047-RSc3174	Low copy number and broad host range cloning vector pUFR047 containing RSp3174, Amp ^r , Gm ^r	李千惠, 2009
pUFR047-PopP2	Low copy number and broad host range cloning vector pUFR047 containing PopP2, Amp ^r , Gm ^r	This study
p35-RSp0213-cHA	High copy number plasmid containing 35S promoter, HA tag at 3' end of RSp0213, NOS terminator, Amp ^r	This study
p35-RSc3174-cHA	High copy number plasmid containing 35S promoter, HA tag at 3' end of RSc3174, NOS terminator, Amp ^r	This study
p35-PopP3-cHA	High copy number plasmid containing 35S promoter, HA tag at 3' end of PopP3, NOS terminator, Amp ^r	吳紅葳, 2013
pUFR047-RSp0213-HA	Low copy number and broad host range cloning vector pUFR047 containing HA tag at 3' end of RSp0213, Amp ^r , Gm ^r	This study
pUFR047- RSp0213 ^{ΔSP21} -HA	Low copy number and broad host range cloning vector pUFR047 containing HA tag at 3' end of RSp0213 ^{ΔSP21} , Amp ^r , Gm ^r	This study
pUFR047- RSp0213 ^{ΔSP47} -HA	Low copy number and broad host range cloning vector pUFR047 containing HA tag at 3' end of RSp0213 ^{ΔSP47} , Amp ^r , Gm ^r	This study



pUFR047-PopP3-HA	Low copy number and broad host range cloning vector pUFR047 containing HA tag at 3' end of PopP3, Amp ^r , Gm ^r	吳紅葳, 2013
pUFR047-PopP3 ^{ΔMT} -HA	Low copy number and broad host range cloning vector pUFR047 containing HA tag at 3' end of PopP3 ^{ΔMT} , Amp ^r , Gm ^r	This study
pBlueScript II SK(+)-up-kan-down-RSp0213	High copy number vector, containing upstream 855 bp of RSp0213, Kan ^r transposon and downstream 772 bp of RSp0213, Amp ^r	This study
p2FGW7.0	Transient expression vector, 35S promoter, EGFP at 5' end, Amp ^r	Karimi et al, 2002
p2GWF7.0-RSp0213	Transient expression vector, 35S promoter, EGFP at 3' end of RSp0213, Amp ^r	This study
p2GWF7.0-RSp0213 ^{ΔSP21}	Transient expression vector, 35S promoter, EGFP at 3' end of RSp0213 ^{ΔSP21} , Amp ^r	This study
p2GWF7.0-RSp0213 ^{ΔSP47}	Transient expression vector, 35S promoter, EGFP at 3' end of RSp0213 ^{ΔSP47} , Amp ^r	This study
p2GWF7.0-PopP3	Transient expression vector, 35S promoter, EGFP at 3' end of PopP3, Amp ^r	吳紅葳, 2013
p2GWF7.0-PopP3 ^{ΔMT}	Transient expression vector, 35S promoter, EGFP at 3' end of PopP3 ^{ΔMT} , Amp ^r	This study
pK7WGF2	For transfection of plants with exogenous genes in <i>planta</i> , 35S promoter, EGFP at 5' end, Kan ^r	Karimi et al, 2005
pMDC83-RSp0213	For transfection of plants with exogenous genes in <i>planta</i> , 35S promoter, EGFP at 3' end of RSp0213, Kan ^r	This study
pMDC83- RSp0213 ^{ΔSP21}	For transfection of plants with exogenous genes in <i>planta</i> , 35S promoter, EGFP at 3' end of RSp0213 ^{ΔSP21} , Kan ^r	This study
pMDC83- RSp0213 ^{ΔSP47}	For transfection of plants with exogenous genes in <i>planta</i> , 35S promoter, EGFP at 3' end of RSp0213 ^{ΔSP47} , Kan ^r	This study
pm-rk	Binary vector carrying PIP2A fused with mCherry for mambrane marker, Kan ^r	Nelson et al., 2007



pBIN-mt-rk	Binary vector pBIN20 carrying ScCOX4 fused with mCherry for mitochondria marker, Kan ^r	Nelson et al., 2007
pCambia1300	For transfection of plants with exogenous genes to study their function in <i>planta</i> , Kan ^r	Hajdukiewicz et al., 1994
pCambia1300-RSp0213	pCambia1300 containing 35S promoter and RSp0213 cloned PvuII from p35-RSp0213-cHA, Kan ^r	This study
pCambia1300-PopP3	pCambia1300 containing 35S promoter and popP3 cloned PvuII from p35-PopP3-cHA, Kan ^r	吳紅葳, 2013
pSfinX-GFP	Binary PVX-expression vector carrying GFP, Kan ^r	Takken et al., 2000
pSfinX-RSp0213	Binary PVX-expression vector carrying RSp0213 and C-terminal HA tag in <i>Clal</i> and <i>AscI</i> , Kan ^r	This study
pSfinX-RSp0213 ^{ΔSP21}	Binary PVX-expression vector carrying RSp0213 ^{ΔSP21} and C-terminal HA tag in <i>Clal</i> and <i>AscI</i> , Kan ^r	This study
pSfinX-RSp0213 ^{ΔSP47}	Binary PVX-expression vector carrying RSp0213 ^{ΔSP47} and C-terminal HA tag in <i>Clal</i> and <i>AscI</i> , Kan ^r	This study
pSfinX-PopP3	Binary PVX-expression vector carrying PopP3 and C-terminal HA tag in <i>SfiI</i> , Kan ^r	吳紅葳, 2013
pSfinX- PopP3 ^{ΔMT}	Binary PVX-expression vector carrying PopP3 ^{ΔMT} and C-terminal HA tag in <i>SfiI</i> , Kan ^r	This study
pSoup	Helper plasmid for PVX-based expression in <i>planta</i> , Tet ^r	Takken et al., 2000



Hanahan, 1983

Starins

E. coli.

DH5α
F⁻φ80*lacZΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 thi-1 gyrA96 reoA1λ⁻*

A. tumefaciens

GV3101	For plant transformation, Rif ^r	Koncz and Schell, 1986
MOG101	GV3101 with pSoup, Rif ^r , Gen ^r , Tet ^r	Takken et al., 2000

R. solanacearum

Pss190	Wild-type, Phylotype I, Biovar 4, high virulence	From AVRDC
Pss4	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, medium virulence	From AVRDC
<i>hrpG::Tn</i>	Pss4 mutant processing <i>Tn5</i> insertion in <i>hrpG</i>	From AVRDC
Pss1308	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, high virulence	From AVRDC
GMI1000	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, medium virulence	Salanoubat et al., 2002
Pss216	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, low virulence	From AVRDC

附表五、培養基與藥品配方

• 培養基 (Medium)

Luria broth (LB) medium

Component	Per Liter
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
→ Adjust pH to 7.0	
Additional 15 g agar for agar medium	

SOB medium

Component	200 mL
Tryptone	4 g
Yeast extract	1 g
NaCl	0.1 g

YEP medium

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

CPG medium

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

523 medium

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





- 凝膠電泳分析 (Agarose gel electrophoresis)

0.5 M EDTA

Component	100 mL
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	18.6 g
H ₂ O	70 mL
10 M NaOH	to pH 8.0
H ₂ O	to 100 mL

50X TAE buffer

Component	per Liter
Tris base	242 g
Glacial acetic acid	57.1 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 mL
→Adjust pH to 8.5	

10X TBE buffer

Component	per Liter
Tris base	108 g
Boric acid	55 g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40 mL

- 青枯病菌與農桿菌質體萃取 (Alkaline lysis)

Solution I

Component	Final concentration	100 mL
40% glucose	50 mM	2.27 mL
0.5 M EDTA	10 mM	2 mL
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM	2.5 mL

Solution II

Component	Final concentration	100 mL
10 N NaOH	0.2 N	2 mL
20% SDS	1%	5 mL
Freshly prepared		

Solution III

Component	100 mL
5 M potassium acetate	60 mL
Glacial acetic acid	11.5 mL
→Adjust pH to 4.8	

- 青枯病菌染色體 DNA 萃取 (Genomic DNA extraction)

Lysis buffer

Component	Final concentration	100 mL
50X TAE	1X	2 mL
3 M NaOAc	20 mM	0.67 mL
20% SDS	1%	5 mL

- 菸草原生質體萃取 (*N. benthamiana* protoplast purification)

K3S medium

Component	Final concentration
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.75 g/L
NH ₄ NO ₃	0.25 g/L
MES (pH 5.7)	0.02 M
Sucrose	400 mM
Dissolve in Gamborg's B-5 basal medium (3.1 g/L)	

Enzyme solution

Component	Final concentration
cellulase R10	1%
macerozyme	0.4%
Dissolve in K3S medium	

W5 solution

Component	200 mL
3 M NaCl	10.3 mL
1 M CaCl ₂	25 mL
0.2 M KCl	5 mL
0.1 M MES (pH 5.7)	4 mL
0.1 M glucose	10 mL

K3M medium

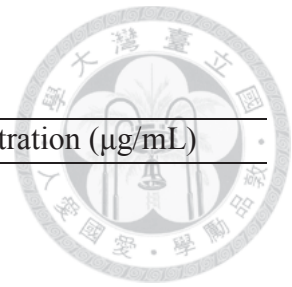
Component	Final concentration
naphthalene acetic acid	2 mg/L
benzylaminopurine	1 mg/L
Add to K3S medium	

PEG solution

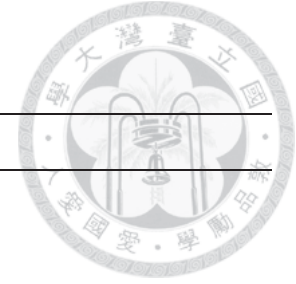
Component	Final concentration
Ca(NO ₃) ₂	100 mM
mannitol	450 mM
PEG 6000	25%

附表六、抗生素濃度與配方

Antibiotic	Stock (mg/mL)	Final concentration (µg/mL)
Ampicilin (Amp)	100	100
Kanamycin (Kan)	100	50
Gentamycin (Gen)	20	50 (<i>E. coli</i>) / 10 (<i>Rs</i>)
Spectinomycin (Spe)	100	100
Tetracycline (Tet) (Dissolve in DMF)	20	20 (<i>E. coli.</i>) / 10 (<i>Rs</i>)
Rifampicin (Rif) (Dissolve in DMSO)	50	50



附表七、本研究中所使用之引子



Primer	Sequence ^a (5'-3')
Check construction	
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-R	AACAGCTATGACCATG
M13-R (for pUFR047)	CAGGAAACAGCTATGAC
Rs check-AU759-F	GTCGCCGTCAACTCATTTC
Rs check-AU760-R	GTCGCCGTGAGCAATGCGGAATCG
RSp0213-low Tm-F	ATGGGATGTTTTAATGTCAC
RSp0213-low Tm-R	TTAACGGCCGGGGCGGT
RSp0213-(n) low Tm-R	ACGGCCGGGGCGGTAG
RSp0213-specific-F	ATGGGATGTTTTAATGTCACTGG
RSp0213-(n) specific-R	ACGGCCGGGGCGGTAGCT
RSc3174-low Tm-F	ATGAAAGTCGGCAACCAATC
RSc3174-low Tm-R	TCAACGTGATAAGTTGTAGC
RSc3174-(n) low Tm-R	ACGTGATAAGTTGTAGCGG
RSp0213 ^{ΔSP21} -specific-F	ATGTCGGTTGAGGCCTCGCCGA
RSp0213 ^{ΔSP47} -specific-F	ATGAGTAACACCGACGCAGCA
popP3-check-F	CGCCATCTTCAGGCT
popP3-check-R	AGGACTCCAGGAGCC
HA-check-R	TTAACGTAGAGAAGCGTAAT
35S-promoter-F	GACAGGCTTCTTGAGATCCTTC
Nos-terminator-R	CAAGACCGGCAACAGGATTCA
Construction for virulence test	
Sall-RSp0213-F	GGGTCGACCCGAAGCGACTGTCATACTC
PstI-RSp0213-R	GGCTGCAGTTTTGGGACTGACGCTCAGT
BamHI-RSc3174-F	GGGGATCCGCATCCGTTACCGTTCACAG
Sall-RSc3174-R	GGGTCGACCACATGGGATACGGAGACAT
EcoRI-RSp0213-F	CCGAATTCATGGGATGTTTTAATGTCACT
EcoRI-RSp0213 ^{ΔSP21} -F	TTGAATTCATGTCGGTTGAGGCCTCGCCGA
EcoRI-RSp0213 ^{ΔSP47} -F	AAGAATTCATGAGTAACACCGACGCAGCAGA



<i>Pst</i> I-HA-R	CCCTGCAGTTAACGTAGAGAAGCGTAATC
<i>Sma</i> I- <i>popP2</i> -F	GGCCCGGGATGAAGGTCAGTAGCGCAAAC
<i>Hind</i> III- <i>popP2</i> -R	AAAAGCTTTTCAGT TGGTTCCAATAGGGAA
<i>Eco</i> RI- <i>popP3</i> -F	AAGAATTCATGCCTGAGAAAGCCCTATG
<i>Kpn</i> I-HA-R	CCGGTACCTTAACGTAGAGAAGCGTAATC
<i>Eco</i> RI- <i>popP3</i> ^{ΔMT} -F	AAGAATTCATGGATGAGAATCAGAACCCTCT
<i>Hind</i> III-HA-R	CCAAGCTTTTAACGTAGAGAAGCGTAATC

Construction for generation of *RSp0213* knockout of *Pss4* strain

<i>Kpn</i> I- <i>RSp0213</i> up-F	GGGGTACCGGACATGAAATCGCGCAT
<i>Eco</i> RI- <i>RSp0213</i> up-R	GGGAATTCGATAATCTCCAAAAAATTGAG
<i>Eco</i> RI-Kan-F	CCGAATTCCTCAAAATCTCTGATGTTAC
<i>Bam</i> HI-Kan-R	CCGGATCCTTAGAAAAACTCATCGAGCA
<i>Bam</i> HI- <i>RSp0213</i> down-F	AAGGATCCCTAAACGTTGCGAAACGAC
<i>Not</i> I- <i>RSp0213</i> down-R	GGGCGGCCGCATGTGCGCTCGGACGAT

Construction for subcellular localization assay

<i>RSp0213</i> -specific-F	ATGGGATGTTTTAATGTCACTGG
<i>RSp0213</i> ^{ΔSP21} -specific-F	ATGTCGGTTGAGGCCTCGCCGA
<i>RSp0213</i> ^{ΔSP47} -specific-F	ATGAGTAACACCGACGCAGCA
<i>RSp0213</i> -(n) specific-R	ACGGCCGGGGCGGTAGCT
<i>popP3</i> -F	ATGCCTGAGAAAGCCCTATGCCA
<i>popP3</i> ^{ΔMT} -F	ATGGATGAGAATCAGAACCCTCT
<i>popP3</i> -(no stop)-R	GGAATCCGTGTCGGTGTCGATC

Construction for transient expression *in planta* and primer for sqRT-PCR

<i>Eco</i> RI- <i>RSp0213</i> -F	CCGAATTCATGGGATGTTTTAATGTCACT
<i>Sal</i> I- <i>RSp0213</i> (n)-R	GGGTCGACACGGCCGGGGCGGTAG
<i>Cla</i> I- <i>RSp0213</i> -F	CCATCGATATGGGATGTTTTAATGTCACT
<i>Cla</i> I- <i>RSp0213</i> ^{ΔSP21} -F	TTATCGATATGTCGGTTGAGGCCTCGCCGA
<i>Cla</i> I- <i>RSp0213</i> ^{ΔSP47} -F	CCATCGATATGAGTAACACCGACGCAGCAGA
<i>Asc</i> I-HA-R	CCGGCGCGCCTTAACGTAGAGAAGCGTAATC
<i>Sfi</i> I- <i>popP3</i> -F	AAGGCCATTATGGCCATGCCTGAGAAAGCCCTATG

SfiI-popP3^{ΔMT}-F

AAGGCCATTATGGCCATGGATGAGAATCAGAACCC
TCT

SfiI-HA-R

AAGGCCGAGGCGGCCTTAACGTAGAGAAGCGTAAT

SIUBI3-F

TGCAGATCTTCGTGAAAACC

SIUBI3-R

AGCGAGCTTAACCTTCTTCT



Primer for qRT-PCR

SA pathway marker in tomato

PR-1a (M69247, PR-P4) 246 bp by primer3

PR-1a_F TCTTGTGAGGCCCAAATTC

PR-1a_R ATAGTCTGGCCTCTCGGACA

PAL (M83324, SA metabolize enzyme) 197 bp by primer3

PAL_F ACGGGTTGCCATCTAATCTG

PAL_R AGCTGTTTTCTGGCTGAAA

GluA (M80604)

GluA_F GCAGGGTTGCAAAATCAAAT

GluA_R TATCATCAGCATGGCCAAAA

GluB (AW030420, PR2b)

GluB_F TCTTGCCCCATTTCAGTTC

GluB_R TGCCAATCAACGTCATGTCT

JA pathway marker in tomato

LoxA (LEU09026)

LoxA_F TGCAGGTTACCTCCCAAATC

LoxA_R AGCAGCGAGTGGTTCTTTGT

WIPI-II (K03291) 242 bp by primer3

WIPI-II_F TGTGATGCCAAGGCTTGTA

WIPI-II_R CTTGTGAACGGGGACATCTT

ET pathway marker in tomato

ACC oxidase1 (NM_001247095) 243 bp by primer3

ACCO1_F TGCGCCATCTTCCTACTTCT

ACCO1_R CCTTGATCAAATCGGGCTTA



PR1b1 (NM_001247385) 167 bp by primer3

PR1b1_F TCTTGTGAGGCCCAAAATTC

PR1b1_R CCAGCACCAGAATGAATCAA

Osmotin (PR5, NP24, osmotin precursor, AF093743)

Osmotin_F TGTACCACGTTTGGAGGACA

Osmotin_R ACCAGGGCAAGTAAATGTGC

Cell death marker in tomato

Hsr203 (SGN-U582565, Hsr203j homologue) 250 bp by primer3

Hsr203_F TCCCGTCATTCTTCACTTCC

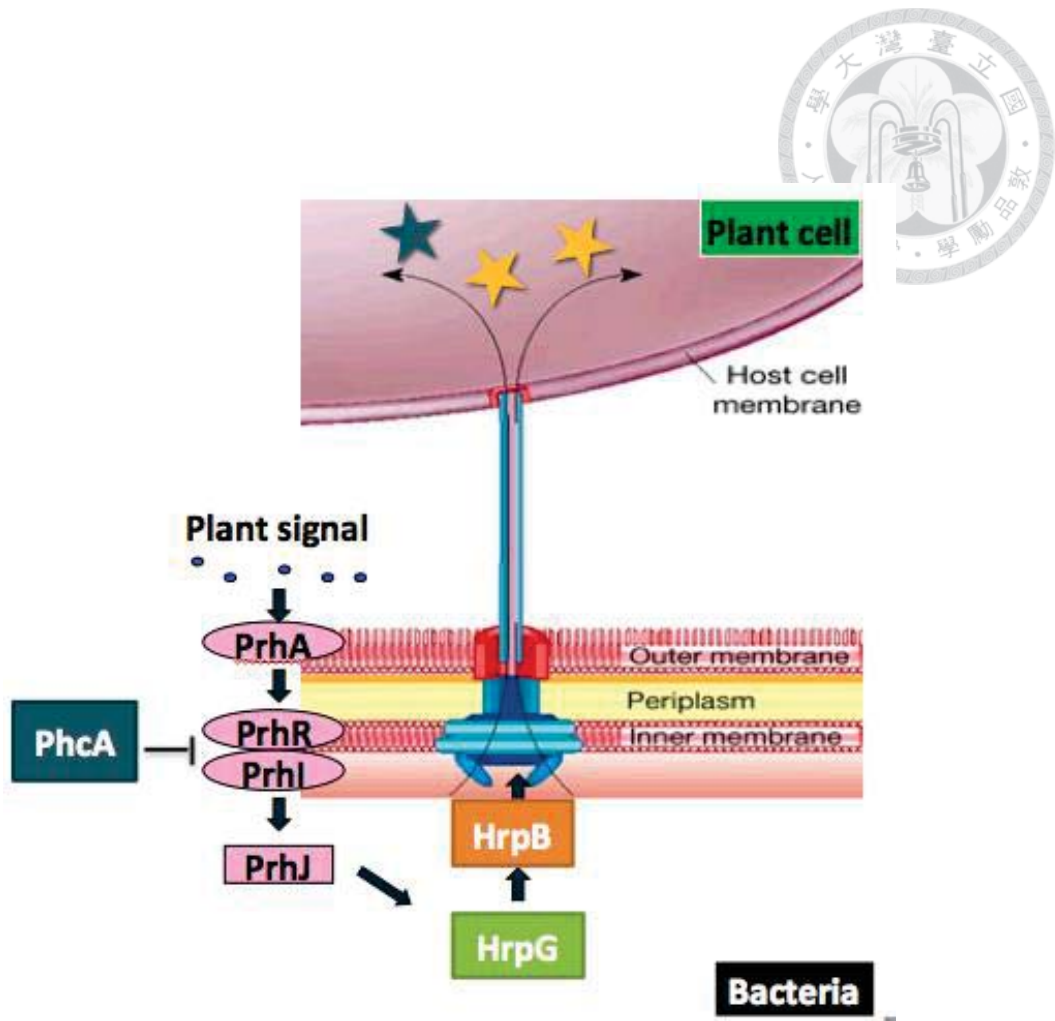
Hsr203_R GTTGAAATCGGCGTATTCGT

Hin1 (SGN-U574797, *Nt*Hin1 homologue) 162 bp by primer3

Hin1_F TCCAACTTGAACGGAGCCTA

Hin1_R TCCGAGGATGATTAGGATGG

^a底線標示為限制酵素辨認序列



附圖一、青枯病菌第三型分泌蛋白調控系統。

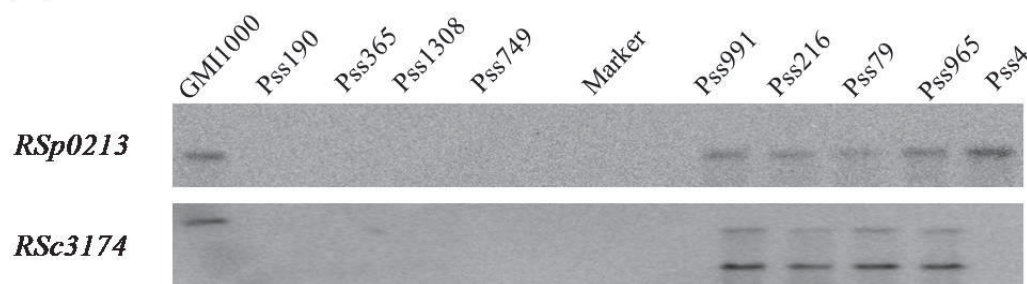


Gene ID	High- virulence				Low- virulence			
	190	1308	749	365	991	965	216	79
100% absent in high; 100% present in low								
IPO1609_0044	0	0	0	0	1	1	1	1
IPO1609_0253	0	0	0	0	1	1	1	1
IPO1609_0436	0	0	0	0	1	1	1	1
IPO1609_0443	0	0	0	0	1	1	1	1
IPO1609_0518	0	0	0	0	1	1	1	1
Molk_0166	0	0	0	0	1	1	1	1
Molk_0199	0	0	0	0	1	1	1	1
Molk_0200	0	0	0	0	1	1	1	1
Molk_0201	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc0840	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1841	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1902	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1912	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1913	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1928	0	0	0	0	1	1	2	1
RSc1932	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1943	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc2706	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc2707	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc2708	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3174	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3174A	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3174B	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3174C	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3175	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3176	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3178	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3187	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0090	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0195	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0213A	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0213B	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0478	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0877B	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1069	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1299	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1303	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1333	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1544	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1545	0	0	0	0	1	1	1	1
SF119	0	0	0	0	1	1	1	1
SF122	2	0	0	0	1	1	1	1
SF109	0	2	0	2	1	1	1	1

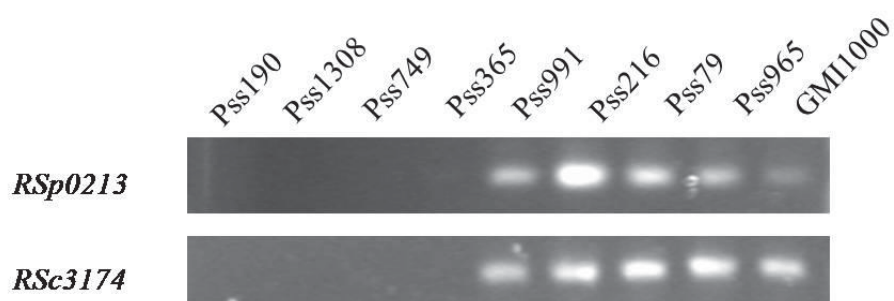
附圖二、低毒力菌株特有之基因 (王肇芬博士實驗室提供，尚未發表)。

微陣列晶片分析結果顯示許多基因獨特存在於低毒力菌株。1，存在；0，不存在；2，無法判讀。本研究目標基因 *RSp0213* 和 *RSc3174* 皆獨特存在於低毒力菌株。

(A)



(B)



附圖三、*RSp0213* 和 *RSc3174* 基因獨特存在於低毒力菌株之驗證^a。

(A) 南方轉漬雜合反應 (Southern blotting)：以 *SalI* 限制酵素水解各菌株染色體 DNA，以 0.7 % 瓊脂凝膠電泳 (30 V/200 min) 後轉至尼龍膜 (nitrocellulose membrane)，利用基因全長之探針雜合後，再以 2X SSC 浸洗尼龍膜，最後以免疫探知作用顯影。

(B) DNA 聚合酶連鎖反應 (genomic PCR)：以各菌株染色體 DNA 做為模版，利用基因全長引子進行聚合酶連鎖反應增幅基因全長片段，共 30 循環 (cycle)。

^a 資料來源：(李千惠, 2009)。

(A) RSp0213 a.a. alignment

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
GMI1000	MGC	FNV	TG	TSG	TAS	NYV	ARE	HS	VE
Pss991	MGC	FNV	TG	TSG	TAS	NYV	ARE	HS	VE
Pss216	MGC	FNV	TG	TSG	TAS	NYV	ARE	HS	VE
Pss79	MGC	FNV	TG	TSG	TAS	NYV	ARE	HS	VE
Pss965	MGC	FNV	TG	TSG	TAS	NYV	ARE	HS	VE

	110	120	130	140	150	160
GMI1000	STA	QNR	IA	Q	LEG	FV
Pss991	STA	QNR	IA	Q	LEG	FV
Pss216	STA	QNR	IA	Q	LEG	FV
Pss79	STA	QNR	IA	Q	LEG	FV
Pss965	STA	QNR	IA	Q	LEG	FV

(B) RSc3174 a.a. alignment

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
GMI1000	ME	VGN	Q	NN	V	G	H	D	F
Pss991	ME	VGN	Q	NN	V	G	H	D	F
Pss216	ME	VGN	Q	NN	V	G	H	D	F
Pss79	ME	VGN	Q	NN	V	G	H	D	F
Pss965	ME	VGN	Q	NN	V	G	H	D	F

	110	120	130	140	150	160	170	180	190
GMI1000	RS	RI	AN	EL	AS	SG	RL	RF	N
Pss991	RS	RI	AN	EL	AS	SG	RL	RF	N
Pss216	RS	RI	AN	EL	AS	SG	RL	RF	N
Pss79	RS	RI	AN	EL	AS	SG	RL	RF	N
Pss965	RS	RI	AN	EL	AS	SG	RL	RF	N

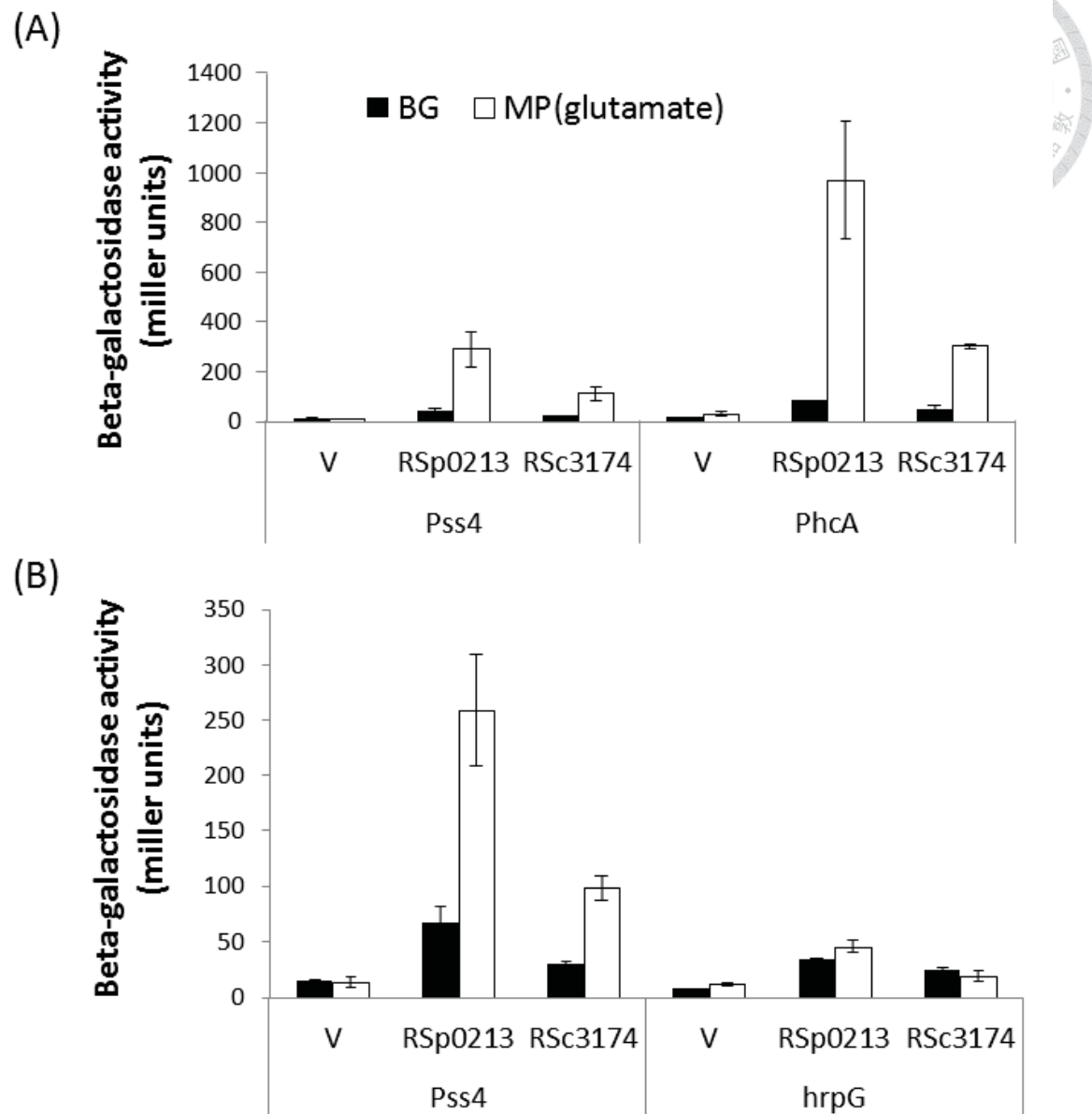
	210	220	230	240	250	260	270	280	290
GMI1000	EL	A	AR	L	BE	A	G	LE	E
Pss991	EL	A	AR	L	BE	A	G	LE	E
Pss216	EL	A	AR	L	BE	A	G	LE	E
Pss79	EL	A	AR	L	BE	A	G	LE	E
Pss965	EL	A	AR	L	BE	A	G	LE	E

	310
GMI1000	AF
Pss991	AF
Pss216	AF
Pss79	AF
Pss965	AF

附圖四、低毒力菌株與代表性菌株 GMI1000 之第三型分泌蛋白 (A) RSp0213 及 (B) RSc3174 胺基酸序列比對具高度保守性^a。

以低毒力菌株 Pss991、Pss216、Pss79、Pss965 之胺基酸序列與 GMI1000 比對，圖中黑色區域表示相同的胺基酸，灰色區域表示胺基酸型質相似，紅色框標示為與 GMI1000 不同的胺基酸。

^a 資料來源：(李千惠, 2009)。



附圖五、選殖 *RSp0213* 和 *RSc3174* 之啟動子片段分析兩組 effector 基因皆受 (A) *PhcA* 及 (B) *HrpG* 調控子之調控^a。

利用 β -galactosidase 分析法檢測在野生型菌株 *Pss4* 及第三型分泌系統缺失突變株 *PhcA::Tn* 和 *hrpG::Tn* 中 *RSp0213* 與 *RSc3174* 之啟動子活性。本實驗將菌培養於 MP 液體培養基，共重複三次，並利用三次數值平均並取其標準差 (SD)。V 為 pCZ962 質體。

^a 資料來源：(李千惠, 2009)。



```
ProtComp Version 9.0. Identifying sub-cellular location (Plant)
Seq name: test sequence, Length=161
Significant similarity by DBSCAN-P - NONE
Predicted by Neural Nets - Nuclear with score 2.5
Integral Prediction of protein location: Nuclear with score 6.8
Location weights: LocDB / PotLocDB / Neural Nets / Pentamers / Integral
Nuclear 0.0 / 0.0 / 2.47 / 3.21 / 6.76
Plasma membrane 0.0 / 0.0 / 0.09 / 0.00 / 0.00
Extracellular 0.0 / 0.0 / 0.00 / 1.40 / 0.03
Cytoplasmic 0.0 / 0.0 / 0.42 / 1.03 / 0.00
Mitochondrial 0.0 / 0.0 / 0.00 / 0.00 / 1.72
Endoplasm. retic. 0.0 / 0.0 / 0.00 / 0.00 / 0.00
Peroxisomal 0.0 / 0.0 / 0.00 / 0.00 / 0.01
Golgi 0.0 / 0.0 / 0.01 / 0.08 / 1.03
Chloroplast 0.0 / 0.0 / 0.00 / 0.10 / 0.00
Vacuolar 0.0 / 0.0 / 0.00 / 0.11 / 0.46

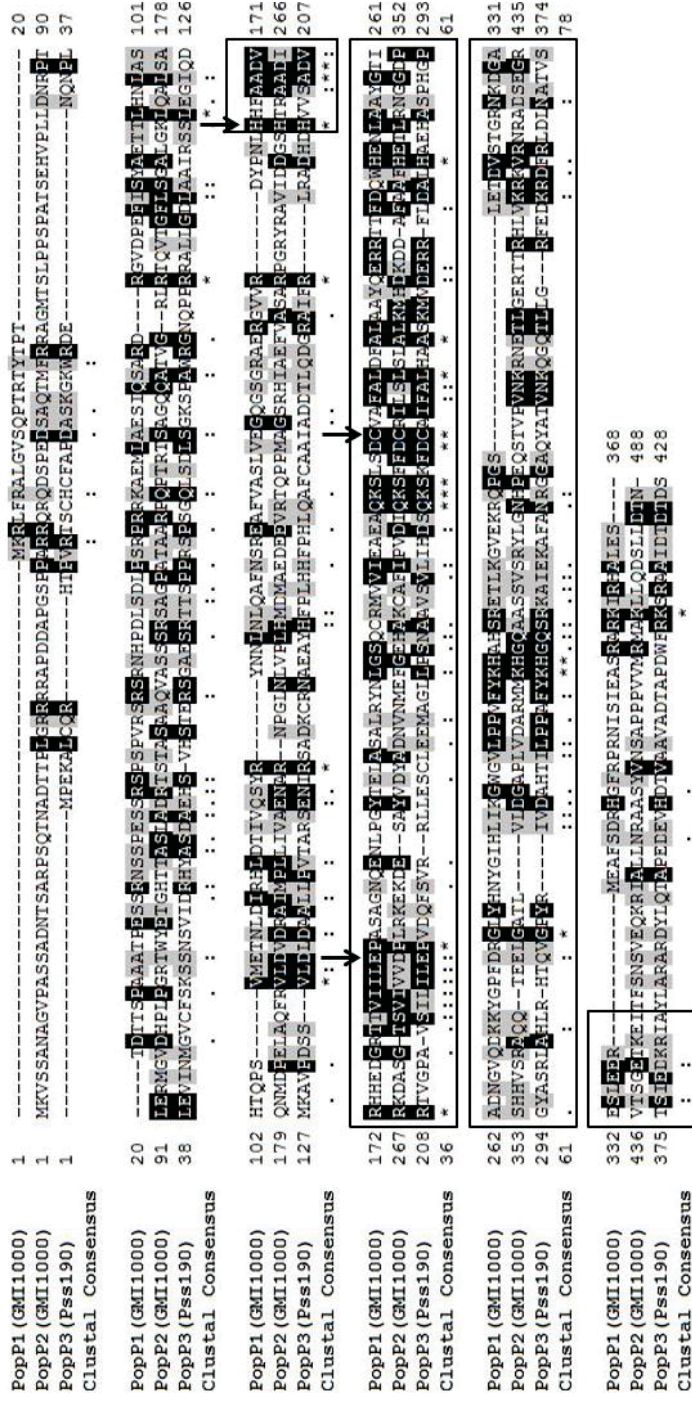
ProtComp Version 9. Identifying sub-cellular location Bacterial (Gramm negative)
Seq name: test sequence, Length=161
Significant similarity by DBSCAN-P - NONE
Predicted by Neural Nets - Secreted with score 3.4
***** Signal 1-47 is found
***** Transmembrane segments are found: .-25:42+...+120:139.
Integral Prediction of protein location: membrane bound Periplasmic with score 7.6
Location weights: LocDB / PotLocDB / NNets / Pentamers / Integral
Cytoplasmic 0.00 / 0.00 / 0.00 / 0.06 / 1.31
Membrane 0.00 / 0.00 / 0.00 / 1.37 / 1.06
Secreted 0.00 / 0.00 / 1.95 / 1.25 / 0.01
Periplasmic 0.00 / 0.00 / 1.05 / 0.32 / 7.61
```

附圖六、RSp0213 蛋白在植物細胞中座落位置之預測

利用 Softberry 網站 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 分析 RSp0213 在植物細胞中可能的座落位置，結果發現 RSp0213 的 N 端 47 個胺基酸構成了導向胜肽 (targeting peptide)，並且在該導向胜肽中預測具有跨膜片段 (transmembrane segments)，顯示 RSp0213 有可能位於植物細胞的細胞膜上。



(A)



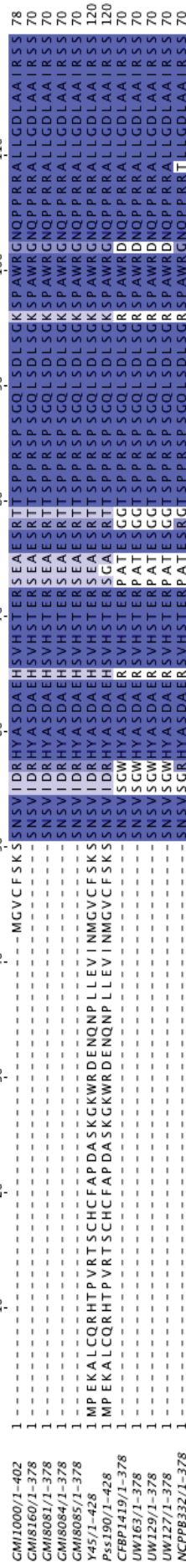
(B)

	PopP1	PopP2	PopP3
PopP1		30%	33%
PopP2	11.6%		26%
PopP3	15%	11.7%	

附圖七、青枯病菌 Pss190 菌株之 PopP3 與 GMI1000 菌株之 PopP1、PopP2 胺基酸序列比對。

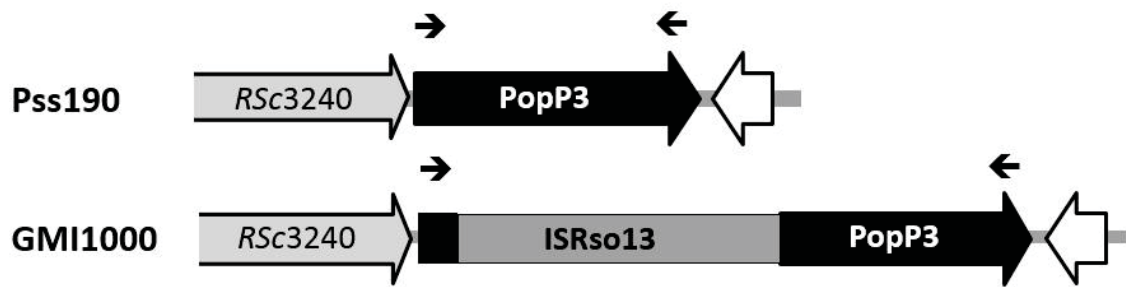
(A) YopJ superfamily 之酵素催化區 (catalytic domain) 標示為黑框區域；箭頭所指為 YopJ superfamily 的保守性胺基酸 (conserved residue)；序列黑色表示為相同之胺基酸，序列灰色表示特性相似之胺基酸。

(B) PopP1、PopP2 與 PopP3 之胺基酸一致性 (identity)。全長序列一致性度標示為表格中白底黑字，而酵素催化區之胺基酸序列一致性度標示為灰底黑字。

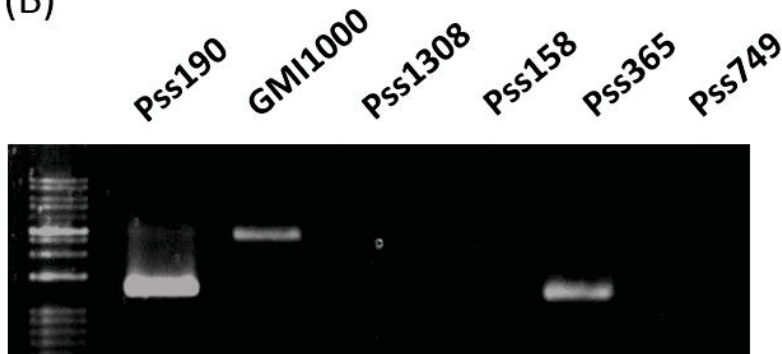


附圖八、Pop3 在各菌株中之蛋白質序列比對結果

(A)



(B)



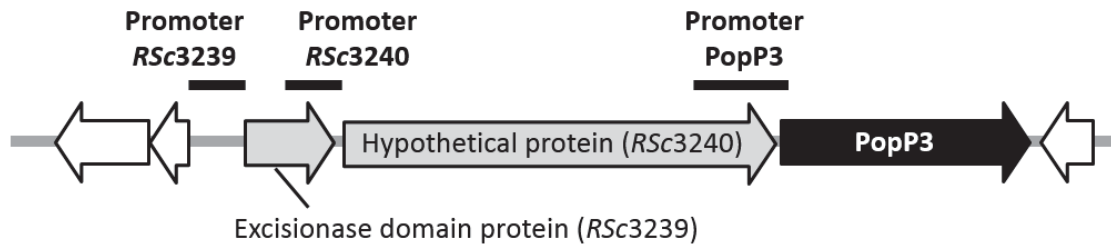
附圖九、青枯病菌 *popP3* 在高毒力 phylotype I 菌株中之存在情形^a。

(A) 青枯病菌 Pss190 與 GMI1000 中 *popP3* 基因圖。GMI1000 中 *popP3* 內插有一跳躍子 *ISRso13*。基因圖上方箭號為染色體 PCR 使用之引子 (primer) 位置。

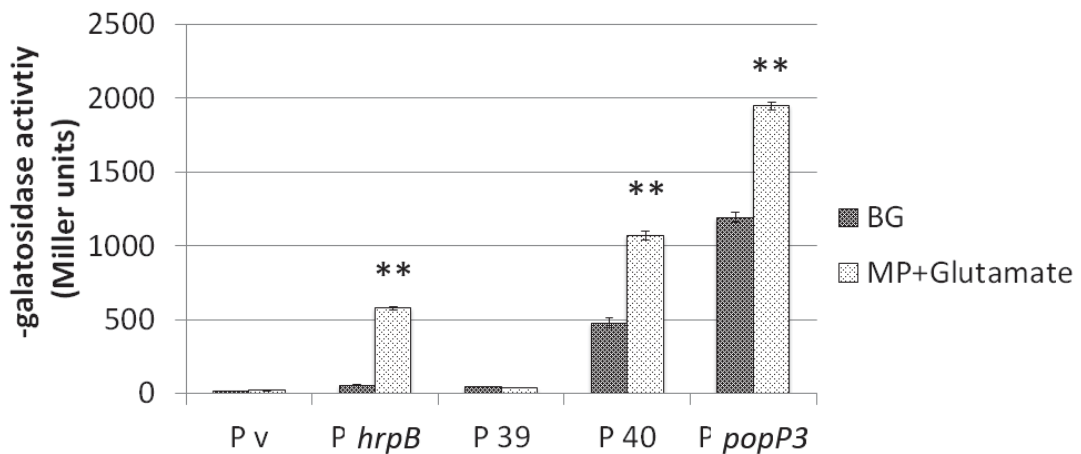
(B) 以染色體 DNA 為模版，利用 PCR 檢測 *popP3* 於高毒力 phylotype I 青枯病菌菌株中之存在情形。Pss190 與 GMI1000 染色體為正控制組 (positive control) (GMI1000 為中毒力菌株，在此僅作為正控制組)，Pss1308 為負控制組 (negative control)。所有染色體 DNA 在 PCR 前皆預先跑膠確認品質；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致。

^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。

(A)



(B)

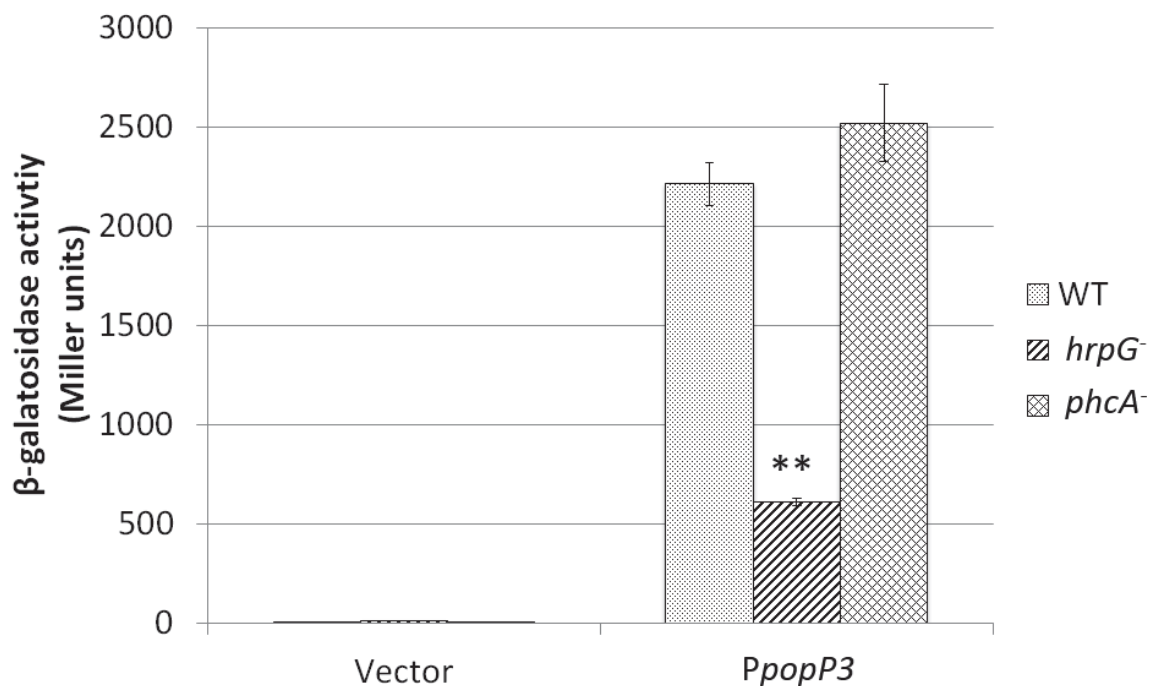


附圖十、基因組結構 (gene cluster) 分析顯示 *popP3* 具有引導自我轉錄之啟動子 P_{popP3} ^a。

(A) 青枯病菌 Pss190 之 *popP3* 基因組結構與啟動子活性試驗中所使用的啟動子位置。P_{RSc3239}：RSc3239 起始密碼子 (start codon) 上游 300 bp；P_{RSc3240}：RSc3240 起始密碼子上游 300 bp；P_{popP3}：*popP3* 起始密碼子上游 500 bp 加上下游 126 bp。*hrpII* box (GTTC-N₁₆-TTTCG) 位於 *popP3* 起始密碼子下游 37 bp。

(B) 在豐富培養基 (BG medium) 和誘導第三型分泌蛋白系統 (T3SS) 表現之培養基 (MP medium+ glutamate) 培養，檢測在 Pss190 中 *popP3* 可能之啟動子位置。Pv：空質體控制組 (pCZ962 vector only)；P_{hrpB}：第三型分泌蛋白調控中樞 *hrpB* 的啟動子，在此作為正調控組，確定誘導第三型分泌蛋白系統表現之培養基正常。每次實驗菌液源自 3 個各別菌落；本實驗共重複兩次，實驗結果趨勢一致；取一次實驗結果呈現，取 3 個菌落數據之標準差 (SD)，以 Student's *t*-test 進行分析，**表示具極顯著差異 ($p < 0.01$)。

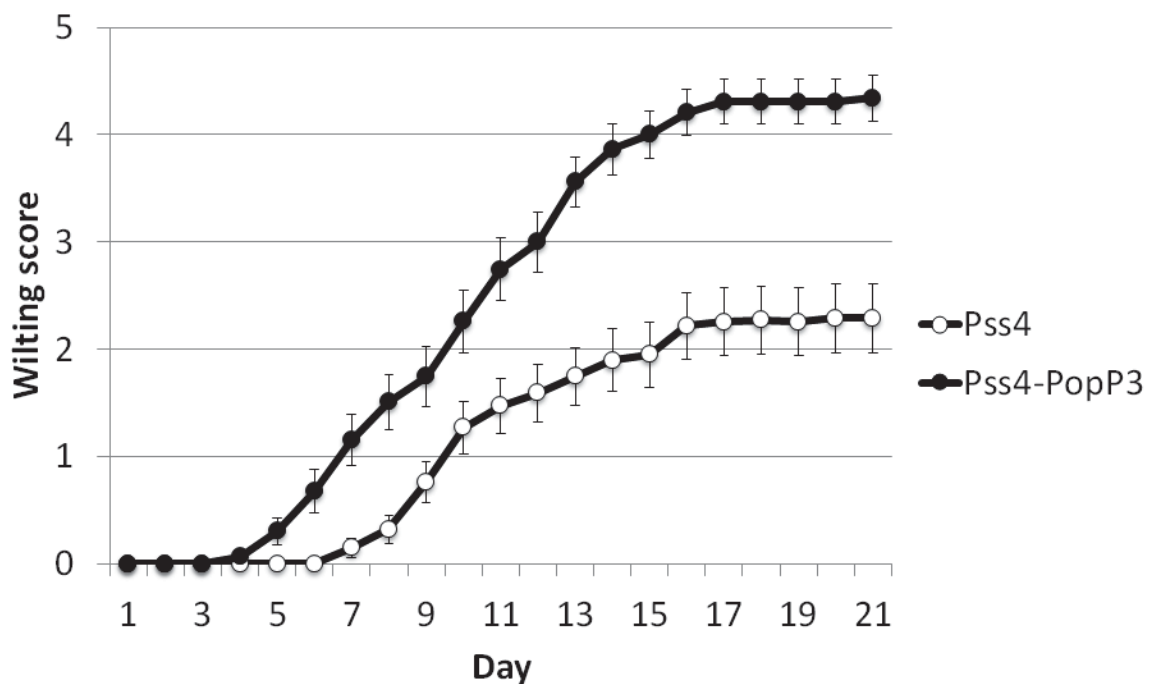
^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。



附圖十一、*popP3* 啟動子 P_{popP3} 會受關鍵轉錄因子 HrpG 調控^a。

在 Pss190 中檢測 *popP3* 啟動子於 *hrpG::Tn* 和 *phcA::Tn* 突變株，以第三型分泌蛋白系統 (T3SS) 誘導培養基 (MP medium+ glutamate) 誘導並檢測 *popP3* 啟動子引導之 β -galactosidase 活性。Pv：空質體控制組 (pCZ962 vector only)； P_{popP3} ：*popP3* 起始密碼子上游 500 bp 加上下游 126 bp。每次實驗菌液源自 3 個各別菌落；本實驗共重複兩次，實驗結果趨勢一致；取一次實驗結果呈現，取 3 個各別菌落數據之標準差 (SD)，以 Student's *t*-test 進行分析，**表示具極顯著差異 ($p < 0.01$)。

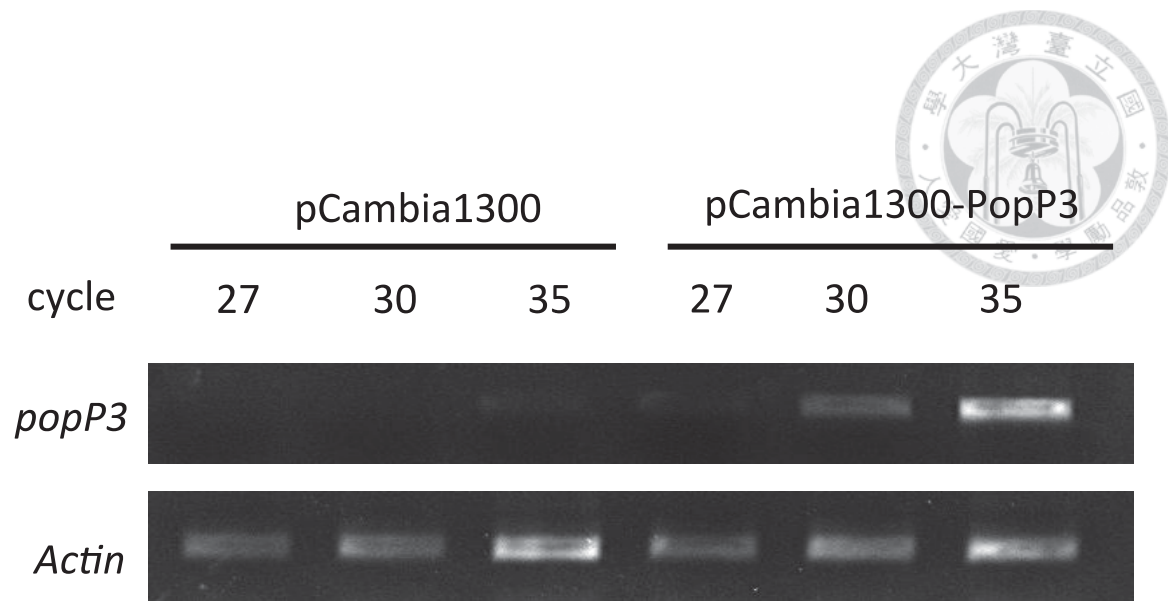
^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。



附圖十二、過量表現 *popP3* 之中毒力青枯病菌 Pss4 提高其在感病品系番茄上之毒力^a。

將大量表現 *popP3* 之中毒力 Pss4 菌株 (O.D.600=0.3) 直接澆灌於 30-35 天大之感病品系番茄 L390 土盆中，定期紀錄其植株發病情形。每次實驗使用 9-20 棵植物；本實驗共重複五次，實驗結果趨勢一致；在此呈現為累計五次實驗共 59 棵植物，所得結果取其標準誤 (SE)。

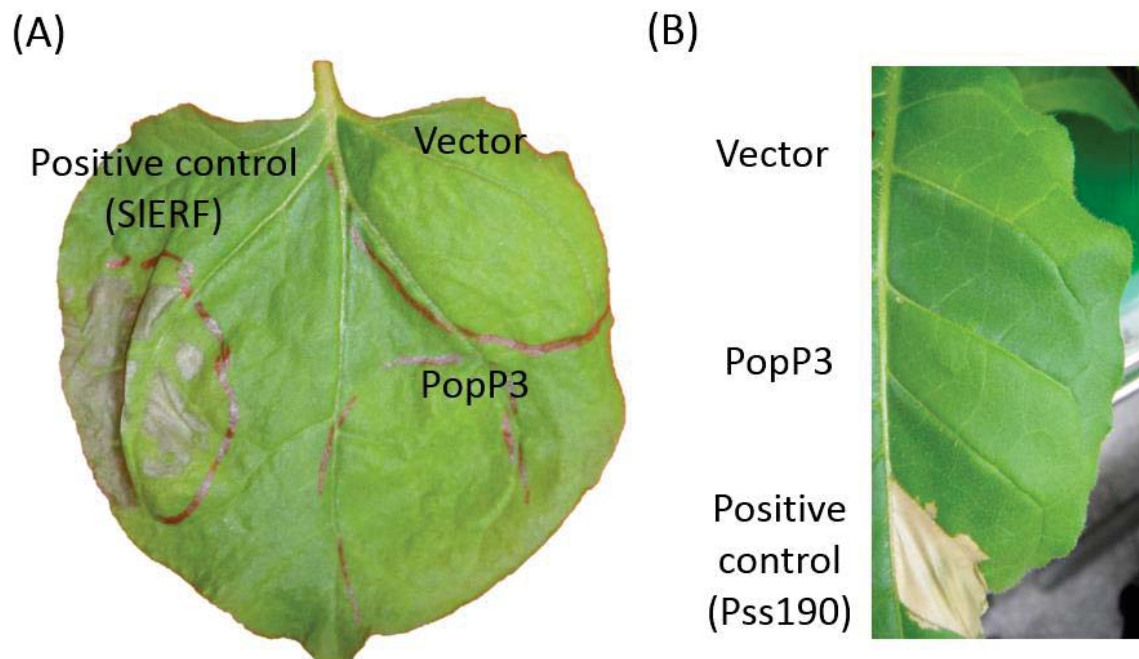
^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。



附圖十三、在菸草短暫表現 *popP3* 之效率檢測^a。

以表現載體 pCambia1300，利用農桿菌輔助注射法將 35S::*popP3* 表現在 *N. benthamiana* 葉部，48 小時後以半定量實驗檢測 *popP3* 基因表現；*Actin* 作為實驗之內控制組 (internal control)；本實驗共重複兩次，實驗結果趨勢一致。

^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。



附圖十四、在菸草短暫表現 *popP3* 後未產生病徵與過敏反應^a。

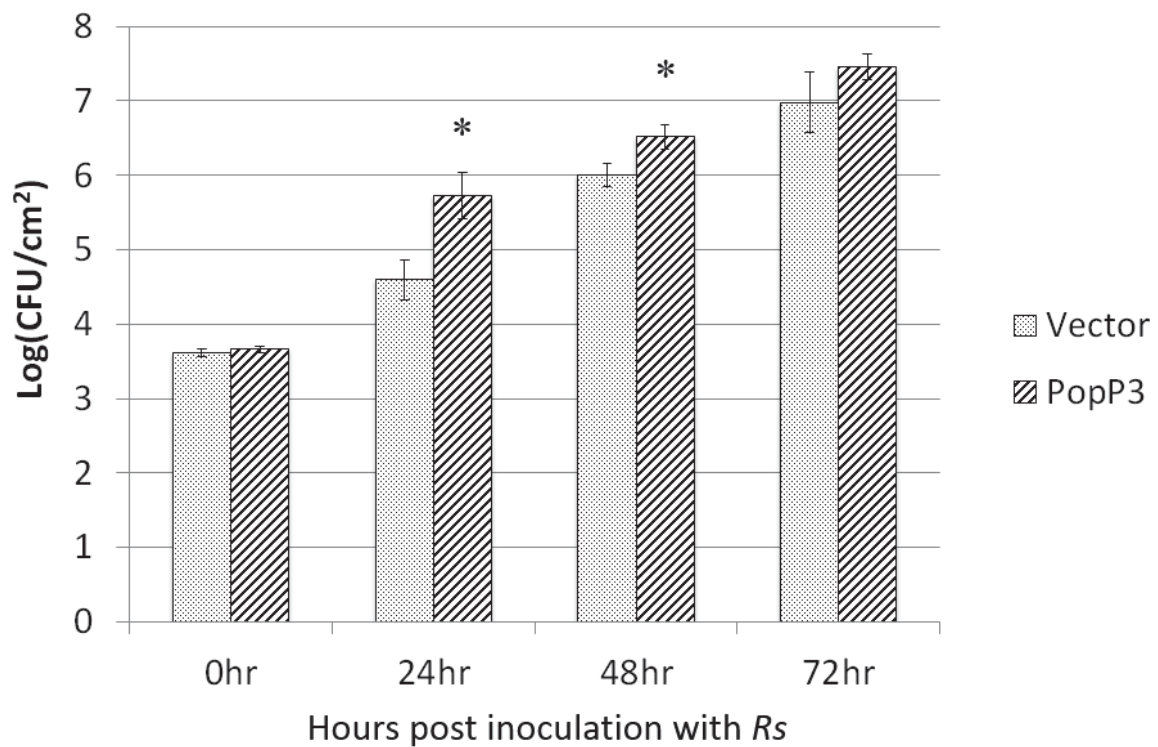
以表現載體 pCAMBIA1300，利用農桿菌輔助注射法將 35S::*popP3* 表現在

(A) 感病品系 *N. benthamiana* 葉部，於注射農桿菌 72 小時後觀察病徵發展；正控制組為可引發植物細胞壞死之番茄基因 ERF68 (劉安琪學長提供)。

(B) *N. tabacum* W38 葉部，於注射農桿菌 24 小時後觀察過敏反應；正控制組為青枯病菌菌株 Pss190。

本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致。

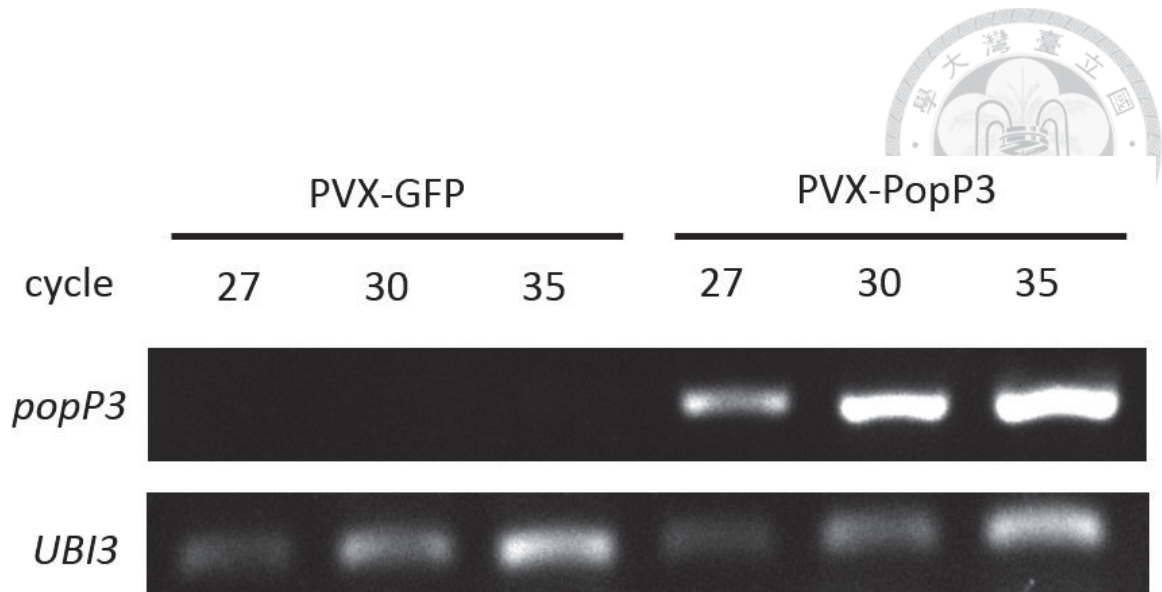
^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。



附圖十五、在短暫表現 *popP3* 之菸草葉中會提升青枯病菌 *Pss4* 之增殖能力^a。

在 *N. benthamiana* 葉部以表現載體 pCAMBIA1300 利用農桿菌輔助注射法將 35S::*popP3* 表現，48 小時後再注射青枯病菌 *Pss4* (10^5 CFU/ml)，紀錄青枯病菌在菸草葉內之增殖情形。每次實驗每個時間點取源自兩株植物共 4 片葉片，取其 9 片葉圓盤，每 3 片葉圓盤合併磨碎進行實驗；本實驗共重複四次，實驗結果趨勢一致；取其中一次實驗結果呈現，單次所得 3 個數值計算其標準差 (SD)，以 Student's *t*-test 進行分析，*表示具顯著差異 ($p < 0.05$)。

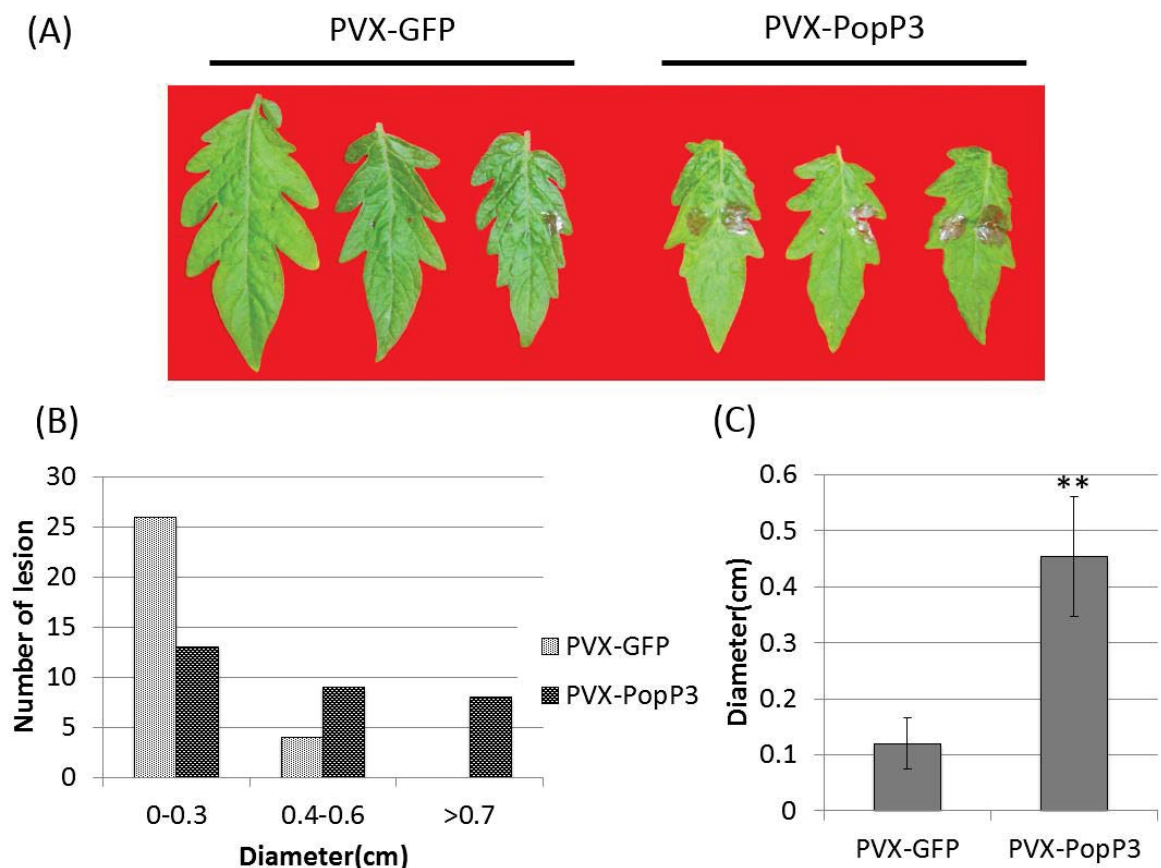
^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。



附圖十六、在番茄短暫表現 *popP3* 之效率檢測^a。

以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體，在 20 天大之抗病品系番茄 H7996 系統性表現 35S::*popP3*，10 天後以半定量實驗檢測 *popP3* 基因表現；*UBI3* 作為實驗之內控制組 (internal control)；本實驗共重複兩次，實驗結果趨勢一致。

^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。



附圖十七、在番茄表現 *popP3* 增強病原菌 *Pcc* 感染病徵^a。

以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體，在 20 天大之抗病品系番茄 H7996 系統性表現 35S::*popP3*，10 天後接種 10^5 CFU/mL 軟腐病菌 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pcc*)

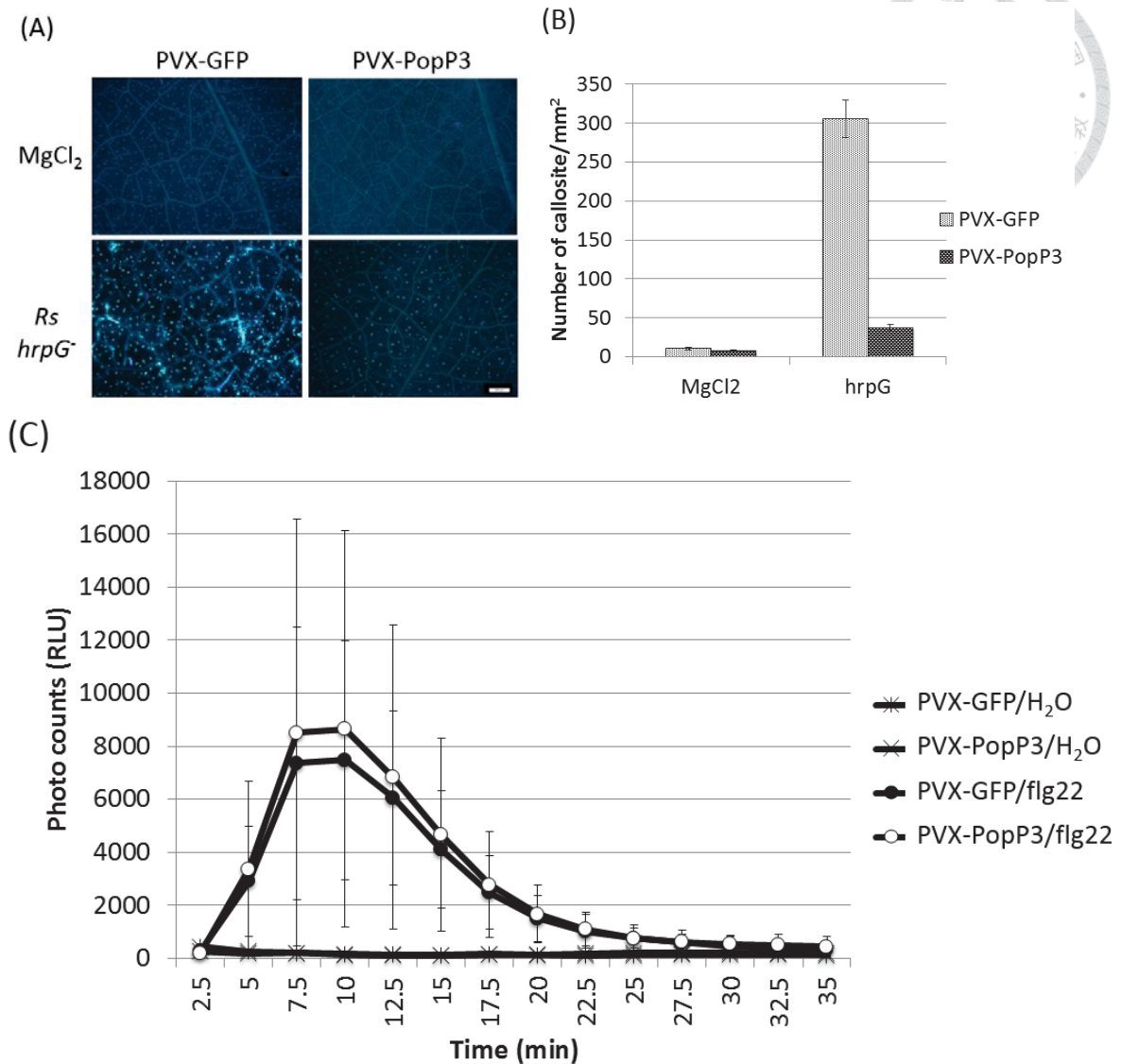
(A) 接種軟腐病菌後 24 小時之病徵。

(B) 接種 24 小時後測量每感染傷口處壞死葉肉組織的最大直徑，將其區分成三個範圍，並將每接種傷口之最大直徑歸於各範圍之下，圖為累計接種傷口數量之結果。

(C) 接種 24 小時後每感染傷口處壞死葉肉組織的最大直徑之結果。

每次實驗使用 2 棵植物共 5 片小葉，一片葉片製造兩個傷口；本實驗共重複三次，實驗結果趨勢一致；在此呈現累計共 15 片葉片、30 個數值的結果，取各重複平均值的標準差 (SD)，以 Student's *t*-test 進行分析，**表示具極顯著差異 ($p < 0.01$)。

^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。



附圖十八、在番茄表現 *popP3* 抑制 PTI 防禦反應^a。

以 PVX (*Potato virus X*) 基因表現載體，在 20 天大之抗病品系番茄 H7996 系統性表現 35S::*popP3*，10 天後檢測其 PTI 防禦反應指標的 (A) (B) 癒傷葡聚糖 (callose deposition) 與 (C) ROS 含量。癒傷葡聚糖含量實驗每次實驗由兩棵植物取至少 12 片葉圓盤；共重複四次，呈現一致結果；在此呈現累計之至少 48 個數值，取其標準誤 (SE)，以 Student's *t*-test 進行分析，**表示具極顯著差異 ($p < 0.01$)。ROS 含量試驗；每次實驗兩棵植物，水處理組 4 個數值，flg22 處理組 20 個數值；共重複三次，呈現一致結果；取一次實驗結果呈現，取其標準差 (SD)。

^a 資料來源：(吳紅葳, 2013)。