

國立臺灣大學生物資源暨農學院
植物病理與微生物學系
碩士論文



Department of Plant Pathology and Microbiology
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

探討 *NbSIR2* 在圓葉菸草對疫病菌 *ParA1* elicitin 反應中的
角色

The role of *NbSIR2* in the response of *Nicotiana benthamiana*
to *ParA1* elicitin of *Phytophthora parasitica*

檀佳季

Jia-Ji Tan

指導教授：劉瑞芬 博士

Advisor: Ruey-Fen Liou, Ph. D

中華民國 111 年 8 月

August, 2022

誌謝



時光荏苒，交出本篇論文的一刻為我來台八年的求學生涯畫下了句點。從瀋陽到台北，我跨越了 1,800 公里，在台大渡過了大學和碩士生涯，創造了數不盡的珍貴回憶，在此，我想感謝一路一來幫助我、陪伴我、支持我的人們。

首先，我要感謝我的指導老師劉瑞芬教授。從大學到研究所，劉老師一直指引著我。一路以來，無論是實驗，每一次上台報告，以及最後的論文和口試，老師總是盡心盡力地指導我也不吝對我的鼓勵。在老師實驗室的時光裡，我也深深被她對學術的熱忱和嚴謹嚴苛的態度所感染，也是我人生學習的榜樣。

在實驗室的生活裡，我要特別感謝我的學姐們-岱妤學姐、怡樺學姐和雅媛學姐，與她們討論總能在我遇到困難時為我解惑，並且我要特別感謝怡樺學姐，不僅為我提供了許多實驗材料也與我分享了許多實驗經驗，對我的研究提供了莫大的幫助。我也非常感謝與我並肩作戰的同學-奕秀和孝軒，與你們一起的研究生活非常難忘和快樂。我還非常感謝我的學弟妹們-芃妤、沛宜、彥愷、宜豐和秉真，謝謝你們的幫忙和陪伴。

另外，本論文的完成要特別感謝中央研究院王昭雯博士提供儀器設備，使我的研究更加充實。

我也要感謝我在台灣結實的各位小夥伴們，無論是我的大學同學們、室友們、足球隊的朋友們以及同樣來台就讀的陸生朋友們，感恩與你們的相識，這會是我一

生都會珍惜的緣分。在此，我也要特別感謝我可愛的男朋友賴宏堯，在我深夜做實驗趕進度和最後忙畢業的時候，一直陪伴我和照顧我，讓我可以心無旁騖。

最後，我要感謝我親愛的爸爸媽媽，他們一直是我身後也是我心中最強大的力量，他們無私的愛以及對我無條件的支持讓我可以放心大膽地追求我的目標，我很幸運可以生長在這樣家庭裡面。你們把我養得這麼好，辛苦了！

希望，我所珍視的大家都能健康和幸福，我會帶著每一份愛，認真地生活！

摘要



被微生物侵染時，植物藉由 pattern-recognition receptors (PRRs) 辨識 microbial-associated molecular patterns (MAMPs) 或植物結構被微生物分解後的 damage-associated molecular patterns (DAMPs) 引發 pattern-triggered immunity (PTI)。根據是否含有 kinase domain，PRRs 被分為 receptor-like kinase (RLKs) 和 receptor-like proteins (RLPs)。SOBIR1 (Suppressor of BIR1-1) 是許多 RLP 型 PRRs 啟動植物防禦反應時重要的 adaptor kinase，也被證實參與植物辨識卵菌 elicitors 的過程。先前的研究藉由蛋白免疫沉澱和液相層析串聯質譜分析在圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 發現多個可能與 *S*SOBIR1 具有交互作用的蛋白，本研究深入探討其中一個基因 (定名為 *N. benthamiana* SOBIR1-interacting RLP 2; *NbSIR2*) 的特性。*NbSIR2* 包含 817 個胺基酸，具備 signal peptide、leucine rich repeat (LRR) domain，以及穿膜區 (transmembrane domain, TMD) 等保守性構造；穿膜區後還有一小段 cytoplasmic tail。接種疫病菌後，*NbSIR2* 的表現量顯著上升，並且過表現 *NbSIR2* 加劇疫病菌 elicitor ParA1 引發的細胞壞疽。蛋白共免疫沉澱實驗證實了 *NbSIR2* 與 *NbSOBIR1* 存在交互作用，共軛焦螢光顯微鏡觀察與序列分析結合推斷 *NbSIR2* 位於植物細胞內質網膜上。SOBIR1 是植物免疫反應的一個關鍵點，本研究對 SOBIR1 調控之免疫反應提供新的研究視野，同時也為植物內質網膜蛋白參與植物的免疫反應提供新的研究方向，其中有更多機制亟待瞭解。

關鍵詞：疫病菌、植物基礎防禦反應、內質網、elicitor, *NbSIR2*, ParA1, SOBIR1

Abstract

When infected by microbial pathogens, plants recognize microbial-associated molecular patterns (MAMPs) or plant-derived damage-associated molecular patterns (DAMPs) through pattern-recognition receptors (PRRs). Depending on the protein structure, PRRs are classified into receptor-like kinase (RLKs) and receptor-like proteins (RLPs), which differ only in the presence of C-terminal kinase domains for RLKs. SOBIR1 (suppressor of BIR1-1) has been identified as an adaptor kinase for various PRRs of the RLP type. As well, it is involved in plant response toward elicitors of *Phytophthora*, including ParA1 from *Phytophthora parasitica*. Previous studies based on co-immunoprecipitation coupled by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) identified various *Nicotiana benthamiana* proteins which might interact with SOBIR1. In this study, one of these genes, named SOBIR1-interacting *N. benthamiana* RLP2 (*NbSIR2*) was characterized for its role in plant response to ParA1. The expression of *NbSIR2* is induced upon *P. parasitica* infection and *NbSIR2* overexpression enhanced ParA1-induced necrosis. Co-immunoprecipitation experiment showed that *NbSIR2* associated with *NbSOBIR1* in *planta* in an elicitor-independent manner. Furthermore, analyses based on sequence prediction and confocal microscopy indicate *NbSIR2* likely locates on the membrane of endoplasmic reticulum (ER). SOBIR1 plays a central role in PTI involving PRRs of the RLP type. This study introduces a new role of *NbSIR2* in SOBIR1-mediated plant immunity and also helps to gain new insight into how ER membrane protein might participate in plant immunity.

Key words: elicitor, endoplasmic reticulum (ER), *NbSIR2*, ParA1, *Phytophthora parasitica*, pattern-triggered immunity, SOBIR1



目錄

一、 前言.....	1
1. 植物防禦反應.....	1
1.1 Pattern Triggered Immunity	2
1.2 SOBIR1	3
2. 疫病菌.....	4
2.1 疫病菌的生活史.....	5
2.2 疫病菌與植物的交互作用	5
2.3 Elicitin	6
3. 內質網與植物防禦反應.....	8
4. 研究動機.....	10
二、 材料與方法.....	11
1. 序列分析及親緣性分析.....	11
2. 供試植物與生長條件.....	11
3. 疫病菌接種實驗.....	11
4. 植物基因表現量分析.....	12
4.1 萃取植物 RNA 並製備 cDNA	12
4.2 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (quantitative reverse transcriptase PCR, qRT-PCR).....	13
5. 製備 ParA1 重組蛋白並處理植物分析其活性.....	14
6. 植物基因靜默.....	15
6.1 載體構築.....	16
6.2 農桿菌感染法	16
7. 過表現 <i>NbSIR2</i>	17
7.1 載體構築.....	17
7.2 農桿菌感染法	18
8. 以化學冷光法 (Chemiluminescence) 檢測活性氧分子.....	18
9. <i>NbSIR2</i> 與 <i>NbSOBIR1</i> 交互作用分析	19
9.1 蛋白共免疫沉澱法 (Co-immunoprecipitation, Co-IP)	19
9.1.1 載體構築	19
9.1.2 TAP-tagged 蛋白純化.....	20
9.2 西方墨點實驗	21
10. 分析 <i>NbSIR2</i> 在植物細胞的分佈情形.....	22
10.1 基因表現.....	22
10.2 以雷射掃描式共軛焦螢光顯微鏡進行觀察	23
11. 統計分析方法.....	23
三、 結果.....	24
1. <i>NbSIR2</i> 序列分析.....	24
2. <i>NbSIR2</i> 親緣關係關係分析.....	24

3.	菸草接種疫病菌後 <i>NbSIR2</i> 表現量上升	25
4.	純化 ParA1 蛋白	26
5.	過表現 <i>NbSIR2</i> 之基因加劇 ParA1 蛋白造成之細胞壞疽	26
6.	靜默 <i>NbSIR2</i> 之基因表現緩解 ParA1 蛋白造成之細胞壞疽	27
7.	<i>NbSIR2</i> -GFP 分佈在內質網膜上	28
8.	<i>NbSIR2</i> 與 <i>NbSOBIR1</i> 之交互作用	29
9.	ParA1 在菸草引發活性氧化物的累積	30
四、	討論	32
1.	<i>NbSIR2</i> 位於 ER membrane	32
2.	<i>NbSIR2</i> 與 <i>NbSOBIR1</i> 具有交互作用	32
3.	<i>NbSIR2</i> 參與 ParA1 引發的免疫反應	33
4.	結語	34




一、前言



1. 植物防禦反應


對於植物來說，微生物既可以是有害的病原菌也可以是有益的共生體。在描述植物與病原微生物的交互作用時，最普遍的模式即為 "the zigzag model" (Jones and Dangl, 2006)。在這個模式中，涉及到兩類植物免疫系統：pattern-triggered immunity (PTI) 和 effector-triggered immunity (ETI)。PTI 是由植物細胞膜上的 pattern-recognition receptors (PRRs) 辨識來自病原菌或微生物的 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)、microbial-associated molecular patterns (MAMPs)，或植物結構被微生物分解後的 damage-associated molecular patterns (DAMPs) 後，所引發的防禦反應 (Boller and Felix, 2009)。為了成功入侵，病原菌會分泌 Avirulence (*Avr*) protein，亦即效應子 (effectors)，進入植物細胞以抑制 PTI，而相應地，植物演化出抗性 (Resistance; *R*) 蛋白，主要為 Nucleotide binding-Leucine Rich Repeat Receptors (NLRs)，可以特異性地辨識效應蛋白，以引發植物抗性，這過程即為 ETI；ETI 的發生常伴隨強烈的過敏性反應 (hypersensitive response; HR)。為抑制植物抗性，病原菌可能再演化產生新的效應蛋白，植物也可能再產生新的抗性蛋白，兩者間上演永不止息的攻防戰 (Jones and Dangl, 2006)。但隨著更多微生物與植物交互作用相關研究的發表，逐漸發現有些病原與植物之間的交互作用不完全符合 "the zigzag model" 的模式，並且 PTI 與 ETI 也很難完全劃分 (Thomma et al., 2011)。近年，不斷有新的模型被提出，例如 Thomma et al. (2015) 提出 "the invasion model"，將 PAMPs、MAMPs、effectors 或源自植物



的 DAMPs 都稱為 invasion patterns (IPs)，而相應的植物受體則統稱為 invasion pattern receptors (IPRs)。在此基礎上，Kanyuka and Rudd (2019) 提出了 "the spatial invasion model"，將 IPRs 依空間分佈位置劃分為細胞膜受體 (cell surface immune receptors; CSIRs; 等同於 PTI 反應中的 PRRs) 和胞內受體 (intracellular immune receptors; IIRs; 等同於 ETI 反應中的 NLRs) (Kanyuka and Rudd, 2019)。以及在 2020 年，Lacaze and Joly 嘗試以免疫反應之 receptors 為基礎將免疫反應劃分為 PRR-mediated immunity 和 NLR-mediated immunity (Lacaze and Joly, 2020)。隨著更多的植物與微生物交互作用的研究發布，關於植物免疫反應的描述，從最經典的 "the zigzag model" 也有著不斷的更新，目的皆在於更完整的描述植物免疫反應，每個新被提出的模型都具其優點但使用中也有需注意的地方，本文仍採用 "the zigzag model" 敘述。

1.1 Pattern Triggered Immunity


PAMPs (或 MAMPs 和 DAMPs) 的本質可能是(醣)蛋白、多醣或脂質類物質，主要被穿膜蛋白 PRRs 所辨識。不同種類 PRRs 的區別首先在於胞外負責結合配體的構造不同：leucine-rich repeat (LRR) domain 辨識蛋白和多肽；lysine Motif (LysM) 辨識醣類；lectin domain 辨識 ATP 或細菌脂多醣；epidermal growth factor (EGF)-like ectodomain 辨識源自植物細胞壁的寡聚半乳糖醛酸 (oligogalacturonate)。另一方面，根據胞內有無 kinase domain，PRRs 可以被分為具有 kinase domain 的 receptor-like kinase (RLKs) 和不具 kinase domain 的 receptor-like proteins (RLPs) (Zipfel, 2014)。無論是 RLKs 還是 RLPs，在傳遞免疫訊號時都會與 co-receptor kinases 結合形成 PRR complexes。胞外構造是 LRR domain 的 LRR-RLKs 會與 BRI1-Associated Receptor Kinase 1/Somatic



Embryogenesis Receptor Kinase 3 (BAK1/SERK3) 和其他相關的 SERKs 結合 (Chinchilla et al., 2009)。相對的，LRR-RLPs 不僅需要 BAK1 和 SERKs，還需要與 Suppressor of Bir1-1 (SOBIR1/EVR) 或 SOBIR1-like 結合 (Liebrand et al., 2014)。與配體結合後，PRRs 被活化，在植物傳遞一系列訊號以啟動防禦反應，首先是胞內鈣離子濃度上升、細胞膜上離子通道打開 (influx of H⁺, efflux of K⁺, Cl⁻, and nitrate)、胞內磷酸化的 BIK1 和 Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) 活化細胞膜上的 RBOHD (respiratory burst oxidase homolog D) 將 O₂ 轉化為活性氧化物 (reactive oxygen species; ROS)，隨後 mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades 也被活化，將免疫訊號傳遞到細胞核啟動防禦基因的表現 (Couto and Zipfel, 2016)。

1.2 SOBIR1

阿拉伯芥 BAK1-interacting receptor-like kinase (BIR1) 的突變會造成植物持續的免疫反應，對 bir1-1 突變株篩選 suppressor mutation 時發現 sobir1-1 可以抑制 bir1-1 突變株的自發性細胞死亡 (Gao et al., 2009)。SOBIR1 是個 LRR-RLK 蛋白，其過表現會造成植物細胞死亡和引發免疫反應，因此可正調控植物免疫反應。隨後在番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中尋找為 RLP Cf-4 和 Ve1 (分別參與對真菌病原 *Cladosporium fulvum* 和 *Verticillium dahlia* 之抗性) 提供 kinase 功能的蛋白時，發現了與阿拉伯芥 SOBIR1 序列相近的番茄同源性蛋白，命名為 S/SOBIR1 及 S/SOBIR1-like；兩者都可與 Cf-4 和 Ve1 結合，並且參與其調控的植物免疫反應 (Liebrand et al., 2013)。除此以外，在阿拉伯芥和菸草的研究發現 SOBIR1 也參與多種 RLPs 的辨識，如 RLP30 調控死體寄生病原真菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 的 sclerotinia culture filtrate elicitor1 (SCFE1) 之免疫反應



(Zhang et al., 2013); 與 RLP42 (Responsiveness to Botrytis Polugalacturonases1, RBPG1) 結合調控對真菌 MAMP endopolygalacturonases (PGs) 之辨識 (Zhang et al., 2014); 與 *Nicotiana benthamiana* RxEG1 結合調控對 *Phytophthora sojae* glycoside hydrolase 12 (GH12) protein XEG1 之辨識 (Wang et al., 2018)。以上研究可以看出 SOBIR1 是參與 LRR-RLP PRRs 辨識的 common adaptor，在植物免疫反應扮演非常重要的角色，但其中的機制還有待研究。SOBIR1 與 RLP 的交互作用是通過它們在穿膜區域共有的 GxxxGxxxG motif 之後訊號的傳遞則依靠 SOBIR1 的 kinase domain 及其與 BAK1 的相互活化作用 (Bi et al., 2016; Van Der Burgh et al., 2019)。另外，在 *N. benthamiana* 的研究顯示，NbSOBIR1 在原生質膜上形成動態的 microdomains，與內質網膜蛋白 NbRLP1 存在交互作用，並且 NbSOBIR1 microdomains 會隨著內質網型態改變，在過表現 NbRLP1 時，處理 *Phytophthora parasitica* ParA1 elicitor 會加速 NbSOBIR1 microdomains 向胞內移動 (Li et al., 2021)。

2. 疫病菌

疫病菌屬 (*Phytophthora*) 的分類位於真核生物中 Sar 超類群、不等鞭毛類 (Stramenopiles)、卵菌綱 (Oomycota)、露菌目 (Peronosporales)、露菌科 (Peronosporaceae)。在人類歷史上一些重大的自然災害的元兇正是疫病菌，比如造成愛爾蘭大飢荒的 *Phytophthora infestans* (Zadoks, 2008)，導致北美森林發生大規模櫟樹猝死病的 *Phytophthora ramorum* (Werres et al., 2001) 等。2014 年 Molecular Plant Pathology 收集了來自 15 個國家與地區的 62 位科學家的投票，從科學研究以及經濟重要性的角度評選出十大卵菌病害，其中六個來自

Phytophthora 屬，可見疫病菌對於農業，林業甚至生態系統都存在威脅，所以關於疫病菌的研究也在不斷進行 (Kamoun et al., 2015)。




2.1 疫病菌的生活史

疫病菌的生活史分為無性世代和有性世代。自然條件下，疫病菌主要為無性世代，在遇到寄主時，其孢囊 (sporangium) 直接發芽或釋放游走子 (zoospores)，其為疫病菌侵染的關鍵。游走子具有兩根鞭毛，一根向前一根向後，具有強大的推進力以助找到寄主；之後游走子脫落鞭毛且形成細胞壁成為靜止子 (cyst)，靜止子發芽長出發芽管 從寄主自然開口或形成壓器 (appressorium) 侵入寄主表皮組織。在感染初期，疫病菌以吸器 (haustoria) 自寄主細胞獲得植物養份，行活體寄生；後期植物細胞死亡，疫病菌轉為死體寄生，故一般被認為是半活體寄生 (hemibiotrophy)。菌絲在陰濕環境中成熟後在寄主表面長出新一代孢囊及產生游走子，擴大感染 (Fawke et al., 2015)。疫病菌的有性世代是經由藏精器 (antheridium) 和藏卵器 (oogonium) 結合形成卵孢子 (oospore)，其可直接發芽或形成孢囊和游走子以侵染寄主。有些疫病菌為同絲型 (homothallism)，單獨培養即可形成卵孢子，例如 *Phytophthora cactorum* 和 *Phytophthora citricola* 等；有些疫病菌為異絲型 (heterothallism)，需要不同的配對型 (A1 與 A2) 相遇才能形成卵孢子，如 *P. infestans*，*P. parasitica* 和 *Phytophthora capsici* 等 (Ko, 1988)。

2.2 疫病菌與植物的交互作用


來自疫病菌的 PAMPs (MAMPs) 包括 *P. infestans* 的 INF1，*P. parasitica* 的 OPEL 和 CBEL，*P. sojae* 的 Pep-13 等 (Fawke et al., 2015)，被植物辨識後可激



發免疫反應，其中一些 PAMPs 引發的免疫反應也被證實需要 PTI 反應中常見的 co-receptor BAK1/SERK3 的參與，如 INF1 (Chaparro-Garcia et al., 2011)。為了成功入侵寄主植物，疫病菌會分泌胞內效應蛋白以抑制自身 PAMPs (MAMPs) 所引發的免疫反應。比如 *P. infestans* 的效應蛋白 AVR3a 會與植物 U-box E3 ligase CMPG1 結合，而使 INF1 無法誘發細胞死亡 (Bos et al., 2010)，同時也會與植物 GTPase dynamin-related protein 2 (DRP2) 結合而抑制免疫反應；DRP2 調控與受體相關的內吞作用 (Chaparro-Garcia et al., 2015)。對於病原菌的效應蛋白，植物依靠相應的抗病蛋白辨識，並啟動強烈的過敏性反應以限制疫病菌的發展，比如馬鈴薯 R3a 會辨識晚疫病菌 AVR3a (Armstrong et al., 2005)。

2.3 Elicitin

Elicitin 最初在 1980 年代末期被發現，Ricci et al. (1989) 發現 *Phytophthora cryptogea* 和 *P. capsici* 分泌的 10 kDa 大小蛋白 (分別命名為 cryptogein 和 capsicein) 會在非寄主菸草造成葉片壞疽，並且會減輕菸草病原菌 *P. parasitica* var. *nicotianae* 的侵染。Elicitins 被認為是卵菌 *Phytophthora* 和 *Pythium* 的 MAMPs，具有跨物種高度保守性：98 個胺基酸的保守性序列區域中包含 6 個在固定位置的胱胺酸 (cystine residues)，其參與形成雙硫鍵 (Boissy et al., 1996; Jiang et al., 2006; Derevnina et al., 2016)。Jiang et al. (2006) 將 128 個 elicitin 的序列進行親緣關係分析，可分成 17 個支序群，其中 4 個為 ELI (elicitin-1-4)，13 個為 ELL (elicitin-like-1-13)；ELI-1 包括 cryptogein、capsicein、*P. parasitica* 的 ParA1 (Kamoun et al., 1993) 和 *P. infestans* 的 INF1 (Panabieres et al., 1995) 等。Elicitins 誘發的免疫反應包括活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 的




累積、鈣離子的流動、MAPK cascades 的活化以及因第二次活性氧化物累積而可能出現的過敏性反應 (Derevnina et al., 2016)。野生馬鈴薯 (*Solanum microdontum*) 的 RLP-elicitin response (ELR) 具有廣泛辨識 elicitins 的能力，包括 ELI-1 分支的 INF1 和 ParA1，ELI-2 分支的 INF2A，ELI-4 分支的 INF5 和 INF6 等，因而推測 ELR 是通過對 elicitins 的保守性構造而非保守性胺基酸序列進行辨識 (Jiang et al. 2006； Du et al., 2015； Derevnina et al., 2016)。並且，INF1 與 ELR 的辨識需要 *Solanum tuberosum* BAK1/SERK3 (Du et al., 2015)。Peng et al. (2015) 發現 ParA1 所引發的防禦反應需要 *St*SOBIR1 的參與。進一步的研究發現，ELR 與 *Sm*SOBIR1 存在固有的結合，共同與 *St*BAK1/SERK3 一起形成 tripartite complex，並且在 INF1 的刺激下，ELR 與 *St*BAK1/SERK3 的結合增強但與 *Sm*SOBIR1 的結合沒有明顯變化 (Domazakia et al., 2018)。Domazakis 等人於 2020 年發表的研究最終確認了 ELR 是 PRR：不論在 *in planta* 或 *in vitro*，ELR 均與 INF1 有交互作用。由於 ELR 具有廣泛辨識 elicitins 的能力，該研究還測試了 ELR 與其他的 elicitins 的交互作用，發現 ELR 與同屬於 ELI-1 分支的 elicitin ParA1 有明確的結合；但是與 CRY2 (屬於 ELI-1 分支) 和 INF2A (屬於 ELI-2 分支) 沒有預期存在的交互作用，推測可能是因為二者與 ELR 的結合較弱，此與二者引發相對較弱程度的細胞壞疽是一致的 (Domazakis et al., 2020)。另值得一提的是，elicitins 可與固醇及其他脂質結合 (Mikes et al., 1998)；由於 *Phytophthora* 和 *Pythium* 無法自行合成生長和產孢所需的固醇 (Hendrix, 1970)，elicitins 很可能負責幫助卵菌吸收固醇類物質 (Mike et al., 1998)，但是其與固醇結合的能力和其作為 MAMPs 誘發免疫反應並不相關 (Dokladal et al., 2012)。



3. 內質網與植物防禦反應

作為真核生物重要的胞器，內質網 (endoplasmic reticulum; ER) 的功能包括參與蛋白質的摺疊、修飾及轉運 (Brandizzi et al., 2003)、脂質的合成 (Wallis and Browse, 2010)，以及維持胞內 Ca^{2+} 平衡等 (Hong et al., 1999)。大部分的內質網以雙層膜平鋪於細胞核外稱為 nuclear envelope，從細胞核向外以 cisternae (sheets) 和 tubules 的型態延伸。位於內質網的蛋白有些位於內質網內腔 (ER luminal protein)，其含有保守性 ER retention signal KDEL，有些嵌合於內質網膜，保守性胺基酸序列為 KKxx (Stornaiuolo et al., 2003)。當蛋白質在內質網被組裝摺疊時，內質網具有精確的 ER quality control (ERQC) system，可通過一些因子管控蛋白質正確摺疊，以及 ER-associated degradation (ERAD) system，以及時降解錯誤摺疊的蛋白 (Howell, 2013)。然而當植物處在非生物或生物逆境，需要生產大量蛋白時，其對蛋白的需求量就會超出 ERQC system 和 ERAD system 的可調控負荷量，此時在內質網所累積之錯誤摺疊或未摺疊蛋白即對植物造成 ER stress，並進一步引發 unfolded protein response (UPR)；UPR 通過上調參與蛋白摺疊與 ERAD 基因之表現量，增加 ER 摺疊蛋白和降解錯誤摺疊蛋白的能力，促使 ER 的工作恢復平衡。若以上調控機制均無法緩解 ER stress，長時間或強烈的 ER stress 最終可能導致細胞凋亡 (program cell death, PCD) (Liu and Howell, 2016)。雖然在生物逆境中，PCD 對於病原菌侵染起到促進或是抑制的效果會因時間點和病原菌的營養型態不同而異，但已經有許多研究明確指出 ER protein 參與植物免疫反應的調控 (Jing and Wang, 2020)。Binding immunoglobulin protein (BiP) 是位於 ER lumen 的重要伴護蛋白 (chaperone)，會與 ER stress sensors 結



合，參與調控 UPR (Srivastava et al., 2013)。過表現 *Nicotiana benthamiana* BiP4 可以消除 Potato virus X (PVX) TGBp3 引發的 PCD (Ye et al., 2011)，而基因靜默 ER luminal protein receptor *NbERD2* 後，BiP 累積量下降會加劇非寄主病原引發的 PCD (Xu et al., 2012)，即 BiP 會抑制 ER stress 所造成的 PCD，並影響病原菌的侵染。NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) 是一類植物的轉錄調節因子，也會參與植物的防禦反應。NTM1 (NAC from the transmembrane motif 1)-like family 中的 NTL9 調控水楊酸合成相關基因 *ICS1* (Zheng et al., 2015)，並且在 *Pseudomonas syringae* 侵染引發的 ETI 反應中參與調控防禦基因的表現 (Block et al., 2014)。在馬鈴薯中，*S. tuberosum* NTP (NAC targeted by *Phytophthora*) 1 和 NTP2 會快速從 ER 釋放再轉移到細胞核以增加對 *Phytophthora* 的抗性 (McLellan et al., 2013)。Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (PPIases) 會催化脯氨酸肽鍵的順反異構化，是蛋白質摺疊過程中的重要步驟；依結構的不同，PPIases 分為三類：cyclophilins (CYPs)，FK506-binding proteins (FKBPs) 和 parvulins (Dunyak and Gestwicki, 2016)。*Arabidopsis thaliana* FKBP65 參與 *P. syringae* 和 *Xanthomonas campestris* 引發的免疫反應 (Mokryakova et al., 2014; Pogorelko et al., 2014)，*AtFKBP15-2* 會調控 UPR 參與 *P. parasitica* 侵染造成的 ER stress (Fan et al., 2018)。但大豆的 PPIases- *Glycine max* CYP1 卻扮演了幫助病原菌入侵的角色，*P. sojae* 會利用其 PPIases 活性來激活自身的 RXLR effector Avr3b 以促進侵染 (Kong et al., 2015)。Calreticulin (CRT) 位於 ER lumen，是高度保守性、參與鈣離子結合和感受的蛋白。CRT3 對於辨識細菌 PAMPEF-Tu 的 RLK-PRR EFR (EF-Tu receptor) 的累積有著重要的作用，阿拉伯芥 *crt3* 突變株無法累積 EFR，導致對 *P. syringae* 的感病性增加 (Li et al., 2009)。內質網膜蛋白 *NbRPL1*

參與調控 elicitor ParA1 引起的免疫反應，並且與 NbSOBIR1 有交互作用，其過表現會增加在 ParA1 處理下 NbSOBIR1 microdomains 向胞內移動 (Li et al., 2021)。綜上，內質網蛋白確實地參與植物免疫反應，但其中的機制複雜，亟待深入研究。

4. 研究動機

番茄 (*Solanum lycopersicum*) SISOBIR1 參與 *P. parasitica* ParA1 引發的防禦反應 (Peng et al., 2015)。為進一步瞭解 SISOBIR1 在植物接受 ParA1 後相關的反應途徑，黃 (2014) 藉由蛋白免疫沈澱和液相質譜分析在圓葉菸草 (*N. benthamiana*) 中尋找在 ParA1 處理下與 SISOBIR1 具有交互作用的蛋白，Shi (2017) 分析其中一個預測為 RLP 的蛋白(命名為 NbRLP1)，Li et al. (2021) 進一步研究發現 NbRLP1 位於內質網膜，並且與位於原生質膜的 NbSOBIR1 存在交互作用。過表現 NbRLP1 加劇 ParA1 在圓葉菸草造成的壞疽，也會增加 ParA1 處理下 NbSOBIR1 microdomains 向胞內移動。本實驗探究另外一個與 SISOBIR1 有交互作用的圓葉菸草 RLP 蛋白 (定名為 SOBIR1-interacting RLP2; SIR2) 的特性及其在 ParA1 elicitor 引發植物防禦反應的角色，希望藉此更加瞭解植物從辨識 elicitor 到引發下游防禦反應的調控過程，以便對植物基礎防禦反應有更清楚的認識。



二、 材料與方法

1. 序列分析及親緣性分析


以 ExPASy translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>) 預測 *NbSIR2* 的胺基酸序列，並以 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 進行蛋白功能性區域分析。進行親緣性分析時，將 *NbSIR2* 的胺基酸序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 和 Sol Genomics Network (SGN) 進行 BLASTp 分析，搜索 *NbSIR2* 在茄科作物中的同源序列，並以 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 進行多重序列比對，再以軟體 MEGAX 選擇 maximum likelihood 法構建親緣關係樹，並以 bootstrap 檢驗法分析 1000 psuedoreplicates。

2. 供試植物與生長條件

栽植實驗所使用的圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 時，先將種子播種於過篩的泥炭土表層，並保持土壤濕潤；至第 10 天，將幼苗移植至將泥炭土與根基旺以 2:1 比例混合的栽培介質，並放置於 25 °C，光照 16 小時的定溫室培養。

3. 疫病菌接種實驗

疫病菌 *Phytophthora parasitica* (菌株編號 94069) 由農業試驗所安寶貞博士提供。製備游走子時，將疫病菌於 10 % V8 培養基 【10% V8 juice (Campbell), 0.02% CaCO₃, 1.5% select agar (Invitrogen)】，在 25 °C 黑暗培養 7 天；待菌落長滿培養

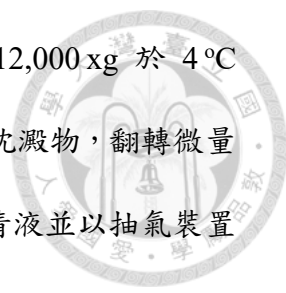


基後，將培養基切成約 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 的菌絲塊，將半個培養基量的菌絲塊轉置於一個培養皿，倒入適量無菌水使沒過菌絲塊，再放置於 25°C 培養箱照光 24 小時，以促進孢囊生成。之後將其移入 4°C 冰箱放置 15 分鐘，低溫刺激孢囊釋放游走子。以紗布過濾去除菌絲塊後，以顯微鏡在血球計數盤 (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) 上計數懸浮液中游走子的濃度，並以無菌水稀釋調整至濃度為 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 後，倒入噴壺準備接種。接種前一日，取 4 週大圓葉菸草置於大型塑膠箱中，在塑膠箱內壁噴水以維持箱內濕度，再將塑膠箱密封放入 28°C 植物生長箱於黑暗中靜置 24 小時以備接種。接種時，將游走子懸浮液均勻噴灑於植物全株至葉片滴水珠，同時再向塑膠箱內壁噴水保持溼度，最後將塑膠箱密封再次放回植物生長箱。接種後第 0、3、6、12 以及 24 小時，分別收集圓葉菸草的第 7 與第 8 片真葉，並迅速以液態氮冷凍後，放置於 -80°C 保存待後續實驗使用。

4. 植物基因表現量分析

4.1 萃取植物 RNA 並製備 cDNA

每處理取兩株植物各一片葉子放入研鉢中，加入液態氮研磨至成為細緻粉末，倒入 1.5-mL 微量離心管至刻度 0.5 mL 的體積，置於冰上待其微溶。RNA 純化使用 RNA extraction reagent (EBL Biotechnology, Taipei City, Taiwan)，取 1 mL 加入植物樣品粉末中震盪混勻，在冰上靜置 5 分鐘後，加入 200 μL 三氯甲烷震盪混勻至樣品成乳化狀，在冰上再靜置 3 分鐘，之後以 $12,000 \times g$ 於 4°C 離心 15 分鐘，取 600 μL 上層液體加入含有 500 μL 異丙醇的 1.5-mL 微量離心管，



上下翻轉微量離心管約 20 次後，在冰上靜置 10 分鐘，再以 12,000xg 於 4°C 離心 10 分鐘，去除上清液，加入 1 mL 70% 的酒精緩慢沖洗沈澱物，翻轉微量離心管 1-2 次後，以 7,500xg 於 4°C 離心 5 分鐘，去除上清液並以抽氣裝置徹底乾燥沈澱物，最後以 50 μ L RNase-free ddH₂O 回溶 RNA，並以 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 定量 RNA 濃度。接下來以 TURBO DNA-free (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 去除殘留於 RNA 溶液中的 DNA：取 10 μ g RNA 以 RNase-free ddH₂O 補至體積為 44 μ L，加入 5 μ L 10X TURBO DNA-free buffer 及 1 μ L TURBO DNase 混勻，靜置在 37°C 一小時以充分去除樣本中殘留的 DNA。反應完畢後加入 6 μ L DNase inactivation reagent 混勻 5 分鐘以終止反應，過程中不斷以手指彈勻以避免沉降，最後以 10,000 rpm 室溫離心 2 分鐘，取 RNA 上清液到新的微量離心管，以 NanoDrop 定量。將 RNA 反轉錄為 cDNA 時，取 1 μ g RNA 加入 1 μ L 10 mM dNTP、1 μ L 25 mM V(dT) 及 RNase-free ddH₂O 至終體積共 14 μ L，混合均勻後，在 65°C 乾浴 5 分鐘，再置於冰上至少 1 分鐘，用 SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 進行反轉錄反應，將 4 μ L 5X SSIV buffer、1 μ L 0.1 M DTT 及 1 μ L SuperScript IV Reverse Transcriptase 加入混勻後，於 55°C 反應 30 分鐘，最後以 80°C 乾浴 10 分鐘以終止反應，得到的 cDNA 用於後續實驗或暫存於 -20°C 冰箱備用。


4.2 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (quantitative reverse transcriptase PCR, qRT-PCR)

將 cDNA 反應液稀釋 3 倍，取出 1 μ L，加入 2 μ L 引子對 (5 μ M)、10 μ L Power

SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Waltham, MA, USA) 及 7 μL ddH₂O。即時定量聚合酶鏈鎖反應使用機器 qTOWER3 (Analytic Jena AG, Jena, Thuringia, Germany)，反應條件為：95°C 10 分鐘，40 個循環之 95°C 15 秒及 60°C 1 分鐘，最後以 1°C / 15 s 自 60°C 升溫至 95°C，以進行 melting curve 分析。

5. 製備 ParA1 重組蛋白並處理植物分析其活性


將帶有 pET-20b(+)-ParA1 表現載體之大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 菌株 C43 (Huang, 2014) 繼代於含有 0.1 ppm ampicillin 的 LA 培養基，在 37°C 培養 12 小時後，挑出單一菌落至含有 0.1 ppm ampicillin 的 LB 液態培養基，在 37°C 震盪培養 16 小時，進行小量培養。隨後將菌液與 terrific broth (TB) 液態培養基 [1.2% tryptone、2.4% yeast extract、0.5% glycerol 溶於水，以高溫高壓滅菌後，加入經 0.22 μm 濾膜過濾的 1 M TB salt (0.17 M KH₂PO₄ 和 0.72 M K₂HPO₄)]，以體積 1:100 的比例混勻，於 37°C 震盪培養約 4 小時，至菌液濃度達到 OD₆₀₀ = 1 後，將菌液置於冰上 15 分鐘，加入 0.4 mM IPTG 在 30°C 震盪培養 24 小時後，收集菌體。將菌液以 10,000 rpm 在 4°C 離心 6 分鐘去除上清液，以 20 mL 之 50 mM potassium phosphate buffer (9.2 mM K₂HPO₄、40.7 mM KH₂PO₄，pH 6.5) 回溶及清洗沈澱物，再以 10,000 rpm 在 4°C 離心 10 分鐘去除上清液，得到菌塊沉澱。將菌塊以每 4 g 的質量搭配 100 mL 回溶 buffer (50 mM potassium phosphate buffer、500 mM NaCl、10 mM imidazole、1 mM PMSF) 混合均勻，採用高壓細胞破碎機 (Avestin EF-C3, Ottawa, Ontario, Canada) 破菌後，以 13,000 rpm 在 4°C 離心 30 分鐘，取上清液以 0.45 μm 濾膜過濾，於每 100



mL 濾液加入 3 mL Ni-NTA agarose (Qiagen, Hilden, Düsseldorf, Germany)，在 4 °C 旋轉震盪結合 12 小時。將 Ni-NTA agarose 填充於 P-10 管柱 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) 中，以濃度由低到高的 imidazole 溶液 (50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5, 500 mM NaCl, 內含 20 mM、60 mM、70 mM、80 mM、100 mM、120 mM 或 200 mM imidazole) 沖洗，並用 1.5 mL 微量離心管收集流洗液，每管收集 1 mL，及以 15% SDS-polyacrylamide gel 分析 ParA1 蛋白在各微量離心管的存在情形。最後將還有 ParA1 蛋白的流洗液裝入 5 kDa 濃縮管 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) 以 8,000 rpm 在 4 °C 離心直到濃縮管中液體僅剩約 2 mL，隨後將濃縮的 ParA1 蛋白溶液裝入 MWCO: 3,500 的透析膜 (Cellu. Sep T1, Membrane filtration products, TX, USA) 以 1X PBS buffer (137 mM NaCl、2.7 mM KCL、10 mM Na₂HPO₄、1.8 mM KH₂PO₄) 進行透析 48 小時 (中間更換 PBS buffer 2 次)。透析後的蛋白溶液用 Bio-Rad protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, CA, USA) 定量，再以 10 mM MES 溶液 (90 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5、7 mM ammonium sulfate、1.5 mM sodium citrate、1 mM MgSO₄、0.2% glucose、0.1 mM CaCl₂) 調整濃度，以供後續實驗使用。處理於植物時，將 ParA1 重組蛋白 (或 10 mM MES buffer 作為對照組) 以針筒從菸草葉片背面注入菸草，並用馬克筆標記注射區域，48 小時後觀察 ParA1 引起的壞疽情形，並拍照記錄。計算 necrosis level 時，以 ImageJ 分別測量 ParA1 處理總面積與引發壞疽的面積，再計算壞疽面積的占比。實驗數據後續以 ANOVA 進行統計分析，以 the Student's *t* test 進行比較。

6. 植物基因靜默

6.1 載體構築



以 SGN 網站針對 *NbSIR2* silencing construct 設計引子對以利用聚合酶鏈鎖反應從 *N. benthamiana* cDNA 增幅 326 bp 且具有專一性的 DNA 片段，PCR 產物以 agarose gel 進行電泳分析，且以 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) 萃取目標長度的 DNA，利用 pCR™8/GW/TOPO TA Cloning kit (Thermo Fisher Scientific) 將純化後的目標 DNA 片段接合到 pCR™8/GW/TOPO vector 上後，轉入 *Escherichia coli*. DH5 α 勝任細胞，在含有 100 ppm spectinomycin 的 LA 培養基篩選，待菌落長出後以 colony PCR 確認，再小量培養後抽取質體 DNA 定序分析。確認目標片段正確接合在質體中後，利用 Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific) 將目標片段轉接到 TRV2-pYL279 以獲得重組質體 TRV2::SIR2，最終將其轉入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞，並在含有 50 ppm kanamycin 的 LA 培養基篩選，待菌落長出後以 colony PCR 確認轉殖成功菌株，抽取其質體利用液態氮凍融法轉入農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101，在含有 50 ppm rifampicin 和 50 ppm kanamycin 的 LA 培養基進行篩選培養，待菌落長出後利用 colony PCR 確認轉殖成功菌株。

6.2 農桿菌感染法

將攜帶不同重組質體之農桿菌菌株 GV3101-TRV2::SIR2、GV3101-TRV2::GFP (Peng, 2013)、GV3101-TRV2::PDS (Peng, 2013) 以及 GV3101-TRV1 在含有 50 ppm rifampicin 和 50 ppm kanamycin 的 LB 培養基於 28 °C 震盪培養 24 小時。取 3 mL 菌液以 5,000 rpm 離心 3 分鐘，去除上清液，將收集到的菌塊以 1 mL MMA buffer (10 mM MES, pH 6.5、10 mM MgCl₂、200 μ M acetosyringone)

回溶，用分光光度計測量菌液濃度後以 MMA buffer 將濃度調整為 $OD_{600}=0.6$ ，在黑暗震盪培養 1 小時。將不同的 GV3101-TRV2 菌液與 GV3101-TRV1 菌液以 1:1 的體積比例混勻，注入 2.5-3 週大的圓葉菸草第 1 和第 2 片真葉葉背，後續將菸草移置 23°C 的溫室培養，三週後取植株的第 7 和第 8 片真葉依前述方法進行基因表現量分析，以確認基因靜默情形。

7. 過表現 *NbSIR2*

7.1 載體構築

利用專一性引子對將 *NbSIR2* ORF 除去終止子之序列從 *N. benthamiana* cDNA 擴增，並接合到 pENTR™ Directional TOPO® vector (Thermo Fisher Scientific) 後，轉入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞。在含有 50 ppm kanamycin 的 LA 培養基篩選，待菌落長出後以 colony PCR 確認，再小量培養後抽取質體 DNA 定序分析，確認目標片段正確接在質體中，得到 pENTR::*NbSIR2*，利用 Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific) 將目標片段轉接到 pK7FWG2 (Karimi et al., 2002)，最終將重組質體轉入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞，在含有 100 ppm spectinomycin 的 LA 培養基篩選，待菌落長出後以 colony PCR 確認轉殖成功菌株，即 DH5 α 攜帶 pK7WG2::*NbSIR2*-GFP。抽取轉殖成功菌株的質體 DNA 利用液態氮凍融法轉入農桿菌 *A. tumefaciens* C58C1，在含有 100 ppm spectinomycin 和 12.5 ppm tetracycline 的 LA 培養基進行篩選培養，待菌落長出後利用 colony PCR 確認轉殖成功菌株，得到帶有 pK7WG2::*NbSIR2*-GFP 的 C58C1 菌株。



7.2 農桿菌感染法

將帶有 *pK7WG2::NbSIR2-GFP* 或 *pK7WG2::GFP* (Peng, 2013) 的農桿菌 C58C1 菌株在含有 100 ppm spectinomycin 和 12.5 ppm tetracycline 的 LB 培養基、28 °C 震盪培養 24 小時後，取 3 mL 菌液以 5,000 rpm 離心 3 分鐘，去除上清液，將收集到的菌塊以 1 mL MMA buffer (10 mM MES, pH 6.5、10 mM MgCl₂、200 μM acetosyringone) 回溶，用分光光度計測量菌液濃度後以 MMA buffer 將攜帶 *pK7FWG2::NbSIR2* 和 *pK7WG2::GFP* 的 C58C1 菌株濃度分別調整為 OD₆₀₀ = 0.8 和 0.3。為抑制植物對外源基因啟動基因靜默，每個處理組另加入攜帶 *pBI::P19* (Voinnet et al., 2003) 的 C58C1 菌株，濃度為 OD₆₀₀ = 0.1。將攜帶 *pK7WG2::NbSIR2-GFP* 的菌株從葉背注射到 4.5 週大的圓葉菸草第 7 和第 8 片真葉的左半葉，同時將攜帶 *pK7WG2::GFP* 的菌株注射到相同葉片的右半葉。48 小時後，從中肋剪開葉片，分別收集左半葉和右半葉，並依前述方法測試基因表現量。

8. 以化學冷光法 (Chemiluminescence) 檢測活性氧分子

在分析植物的 ROS 反應強度時採用 luminol-based 化學冷光法檢測活性氧分子 (Bisceglia et al., 2015)。將菸草葉片以 5-mm 打孔器處理成 leaf disc 後，放入無菌水中，使其漂浮，於室溫下避光靜置過夜，以消除 wounding effect。之後以 tip 小心將 leaf disc 轉移至含有 200 μL 酵素催化反應液 (20 μg/mL horseradish peroxidase, 64.3 μM L-012 (both from Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 之白色 96 孔盤中，置於室溫避光靜置 20 分鐘後，加入 50 μL ParA1 重組蛋白，立即放入多功能盤式讀取儀 (SpectraMax Paradigm Molecular Devices,

San Jose, CA, USA) 偵測冷光，每 2 分鐘記錄一次 (integration time = 1,000 ms)，共 60 分鐘。



9. *NbSIR2* 與 *NbSOBIR1* 交互作用分析

9.1 蛋白共免疫沉澱法 (Co-immunoprecipitation, Co-IP)


9.1.1 載體構築

構建 TAP-tagged 表達載體時，先以 *AscI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 酵解 pENTR::*NbRLP1*-TAP (Li, 2021) 和 pENTR::*NbSIR2*。pENTR::*NbSIR2* 含有一個 *AscI* 切位，以 *AscI* 切開後續以 antarctic phosphatase (New England Biolabs) 去除 5' 磷酸根作為載體，另以 *AscI* 切割 pENTR::*NbRLP1*-TAP 後釋放的 TAP-tag 做為 insert，將兩者依 molar ratio 3:1 之比例 (亦即載體與 insert 分別為 100 ng 與 18.87 ng) 混合，並加入 T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) 後，在室溫反應 2 小時進行 ligation，後轉入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞，在含有 50 ppm kanamycin 的 LA 培養基篩選，待菌落長出後以 colony PCR 確認，再小量培養後抽取質體 DNA 進行定序分析，確認目標片段正確接在質體中，得到 pENTR::*NbSIR2*-TAP 後，再利用 Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific) 將目標片段轉接到 pK7WG2 (Karimi et al., 2002)，最終將重組質體 pK7WG2::*NbSIR2*-TAP 轉入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞，在含有 100 ppm spectinomycin 的 LA 培養基篩選，待菌落長出後以

colony PCR 確認轉殖成功菌株。抽取轉殖成功菌株的質體 DNA 利用液態氮凍融法轉入農桿菌 *A. tumefaciens* C58C1，在含有 100 ppm spectinomycin 和 12.5 ppm tetracycline 的 LA 培養基進行篩選培養，待菌落長出後利用 colony PCR 確認轉殖成功菌株，得到 攜帶 pK7WG2::*NbSIR2*-TAP 之 C58C1 菌株。

9.1.2 TAP-tagged 蛋白純化


將攜帶 pK7WG2::*TAP* (Li, 2019)、pK7WG2::*NbSIR2*-TAP、pK7WG2::*NbSOBIR1*-mCherry (Li, 2019) 或 pK7WG2::*VAP27-1*-mCherry (Li, 2019) 的 C58C1 菌株分別培養於含有 100 ppm spectinomycin 與 12.5 ppm tetracycline 的 LB 液態培養基，另攜帶 pBI::*P19* 的 C58C1 菌株培養於含有 100 ppm kanamycin 與 12.5 ppm tetracycline 的 LB 液態培養基。於 28 °C 以 225 rpm 震盪培養 24 小時後，取 3 mL 菌液以 5,000 rpm 離心 3 分鐘，收集到的菌塊以 1 mL MMA buffer (10 mM MES, pH 6.5、10 mM MgCl₂、200 μM acetosyringone) 回溶，用分光光度計測量菌液濃度後，並以 MMA buffer 調整菌液濃度，其中 C58C1 harboring pK7WG2::*TAP* 或 pK7WG2::*NbSIR2*-TAP 的濃度為 OD₆₀₀ = 0.4，C58C1 harboring pK7WG2::*NbSOBIR1*-mCherry 或 pK7WG2::*VAP27-1*-mCherry 的濃度為 OD₆₀₀ = 0.2。另外，為抑制植物對外源基因的靜默作用，將 C58C1 浸潤至 4 週大圓葉菸草的新完全展開葉時，還加入濃度為 OD₆₀₀ = 0.1 的 C58C1 harboring pBI::*P19*。以農桿菌浸潤 42 小時後，取 1.5 g 葉片，以液態氮研磨成細緻粉末，待研鉢及樣品稍回溫時，加入 3 mL extraction buffer (GTEN buffer: 10% glycerol, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl，以及新鮮加入的 10 mM DTT，1.5% Triton X-100 和 protease inhibitors cocktail (Roche Molecular Systems,



NJ, USA) (Sacco et al., 2007) 回溶後，轉置於 15-mL falcon tube，並於冰浴靜置 2 分鐘，續於 4 °C 以 1,000 rpm 快速離心 1 分鐘去掉大部分葉片殘渣後，將上清液吸出轉移到新的 15-mL falcon tube，再次於 4 °C 以 12,000 g 高速離心 10 分鐘，小心吸取上清液至新的 15-mL falcon tube，此為 Input，保留其中 60 μ L 於後續蛋白質電泳實驗使用，其餘用於免疫沉澱實驗。將 IgG Sepharose 6 FF (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 輕柔彈勻，每組處理取 100 μ L 以 1,000 g 離心 1 min 去除上清液後，加入 500 μ L GTEN buffer 混勻，以 1,000 g 離心 1 min，去除上清液，視為清洗一次，共需清洗 3 次，最後一次離心後留少許上清液，沖散 IgG Sepharose 6 FF 後，吸出轉移到裝有 Input 的 15-mL falcon tube 中，在 4 °C 持續緩慢旋轉混合 3 小時。取出裝有 Input 的 15-mL falcon tube，以 4 °C 1,000 g 離心 1 分鐘，去除上清液。將 10 mL 含有 1.25 mM PMSF 的 GTEN buffer 加入至沉澱的 IgG Sepharose 6 FF，輕柔旋轉 2 分鐘後以 4 °C 1,000 g 離心 1 分鐘，去除上清液，即為清洗 1 次，共需清洗 4 次，最後一次離心後剩下少許上清液，沖散沉澱物，吸出轉移到新的 1.5-mL 微量離心管，於 4 °C 以 1,000 g 離心 1 分鐘後，徹底去除上清液。將沉澱以 80 μ L MURB (50 mM sodium phosphate, 25 mM MES, pH 7.0, 1% SDS, 3M urea, 5% β -mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue) 再懸浮，95 °C 乾浴加熱 5 分鐘，最後再以 1,000 g 離心 1 分鐘，吸取上清液至新的 1.5-mL 微量離心管，即為免疫沉澱物。

9.2 西方墨點實驗


由於偵測的帶有不同抗原的蛋白大小不同，分別配製 7.5% 和 10 % 的 SDS-polyacrylamide gel，將 Input 以 1:1 的比例與 MURB 混合後，於 95 °C 乾浴加



熱 5 分鐘，即可與上述免疫沉澱物於 7.5% 和 10% 的 SDS-polyacrylamide gel 進行分析：以電壓 200 V、25 mA/片進行電泳分析約 50 分鐘，所使用的電泳緩衝液為 Tris-glycine buffer [25 mM Tris, 250 mM glycine, pH 8.3, 0.1% (w/v) SDS]。將不同濃度的 SDS-polyacrylamide gel 利用半濕式蛋白轉漬槽 (Bio-Rad, CA, USA) 以電壓 25 V、40 mA/片、30 分鐘將蛋白轉漬於 PVDF 膜。進行西方墨點分析時，將 PVDF 膜浸置於 blocking buffer (5% silk milk in PBS buffer: 3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 於室溫震盪 30 分鐘後，以 PBS 清洗 PVDF 膜。將轉漬自 7.5% SDS-polyacrylamide gel 的 PVDF 膜加入以 1% silk milk 稀釋 10,000 倍之 PAP antibody (Jackson immune research, PA, USA)，於室溫震盪作用 1 小時，再以 PBS 震盪沖洗 10 分鐘 3 次後，取出 PVDF 膜於室溫下正面淋滿 HRP substrate (Millipore, Burlington, MA, USA) 即可以 Fiji Super RX-N 底片偵測 TAP- tagged 蛋白之訊號。將轉漬自 10% SDS-polyacrylamide gel 的 PVDF 膜加入以 1% silk milk 稀釋 5,000 倍之 anti-mCherry antibody (Wu et al., 2011)，於室溫震盪作用 1 小時，並以 PBS 震盪沖洗 10 分鐘 3 次後，加入以 1% silk milk 稀釋 10,000 倍之 anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase (HRP)-linked whole antibody (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)，於室溫震盪作用 1 小時，再次以 PBS 震盪沖洗 10 分鐘 3 次後，取出 PVDF 膜於正面滴滿 HRP substrate (Millipore)，最後以 Fiji Super RX-N 底片偵測 mCherry-tagged 蛋白之訊號。

10. 分析 *NbSIR2* 在植物細胞的分佈情形

10.1 基因表現



將攜帶 *pk7WG2::NbSIR2-GFP* 與 *35S::ACA8-mCherry* (Postma et al., 2016; 細胞膜標記蛋白), *pBIN20::mCherry-KDEL* (Nelson et al., 2007; 內質網標記蛋白) 的農桿菌依照前述法將蛋白表現在四週大圓葉菸草的新完全展開葉, 濃度分別為 $OD_{600} = 0.8$ (*pk7FWG2::NbSIR2*)、 0.2 (*35S::ACA8-mCherry*) 以及 0.1 (*pBIN20::mCherry-KDEL*)。另每個處理組添加 $OD_{600} = 0.1$ 之 C58C1 harboring *pBI-P19* 以防植物對外源基因的靜默作用。

10.2 以雷射掃描式共軛焦螢光顯微鏡進行觀察

以農桿菌浸潤法在圓葉菸草過表現蛋白 44 小時後, 取葉片剪下適當大小的葉片, 葉背朝上置於載玻片, 於葉片正上方滴水少許, 蓋上蓋玻片, 以棉花棒將玻片間空氣小心推出後, 以共軛焦螢光顯微鏡 (Zeiss LSM 510 Meta 或 Zeiss LSM 880, 中央研究院植物暨微生物學研究所) 觀察。GFP 蛋白的激發光波長為 488 nm, 接收發散光波長為 500-550 nm, mCherry 蛋白的激發光波長為 543 nm, 接收發散光波長為 565-615 nm。

11. 統計分析方法

本研究所使用資料分析方法為 the Student's *t* test, 分析處理組與對照組在 α level = 99% ($p < 0.01$) 或 95% ($p < 0.05$) 之下的差異。

三、 結果




1. *NbSIR2* 序列分析

黃(2014)以蛋白免疫共沉澱配合液相層析串聯式質譜分析，鑑定出在疫病菌 ParA1 elicitor 處理下可能與 *S/SOBIR1* 具有交互作用的圓葉菸草蛋白，其中編號 NbS00039543g0002.1 的蛋白被預測為 receptor-like protein (RLP)。因為它是本實驗室第二個被研究、可能與 *S/SOBIR1* 有交互作用的圓葉菸草蛋白，故定名為 *Nicotiana benthamiana* *SOBIR1*-interacting RLP 2 (*NbSIR2*)。利用 InterPro 進行胺基酸序列分析，發現 *NbSIR2* 含有 817 個胺基酸，自 N 端到 C 端的保守性結構分別包括 signal peptide, 由 11 個 leucine rich repeats 構成的 LRR domain，以及穿膜區 (transmembrane domain, TMD)；穿膜區後還有一小段 cytoplasmic tail (圖一 A)。值得注意的是 TMD 包含一個 *SOBIR1* 結合位點 (*SOBIR1*-interacting motif: GxxxG) (圖一 A)；*SOBIR1* 作為 adaptor kinase 參與多種 MAPMs 引發的免疫反應，是植物 PTI 反應的重要調控因子(Gust and Felix, 2014)。

2. *NbSIR2* 親緣關係關係分析

為了瞭解 *NbSIR2* 同源性基因在其他茄科作物 (Solanaceae) 的存在情形，以 BLASTp 在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 和 Sol Genomics Network (SGN) 篩選出茄科植物潛在的 *NbSIR2* 同源性序列，親緣關係分析發現 *Nicotiana attenuata* OIT05229.1 是與 *NbSIR2* 親緣關係較



近的同源序列 (圖一 B)，與這兩筆序列分在同一支序群的還包括四筆同樣來自 *Nicotiana* 的序列：*Nicotiana tabacum* XP_016494700.1、*Nicotiana sylvestris* XP_009788947.1、*N. tabacum* XP_016512654.1 和 *Nicotiana tomentosiformis* XP_009624629.1。NCBI 對以上序列的註解為 *N. attenuata* OIT05229.1、*N. sylvestris* XP_009788947.1、*N. tabacum* XP_016494700.1 和 *N. tabacum* XP_016512654.1 為 LRR-RLK，*N. tomentosiformis* XP_009624629.1 為 LRR-RLP。但進一步在 InterPro 分別分析其胺基酸序列，發現以上五筆序列均與 *NbSIR2* 一樣被預測為 LRR-RLP。有趣的是，在 NCBI 與 SGN 從馬鈴薯和番茄中比對到的 *NbSIR2* 潛在同源序列，位列於上述菸草序列之外的支序群，與 *N. benthamiana* QZL10980.1 (*NbRRLP1*) 之親緣關係較近。綜上，*NbSIR2* 很可能是 *Nicotiana* 中獨有的序列，在茄科作物的其他重要模式植物無法發現其同源序列，其獨特的存在是如何參與菸草對 elicitor 以及疫病菌的免疫反應過程十分值得進一步研究。

3. 菸草接種疫病菌後 *NbSIR2* 表現量上升

為瞭解 *NbSIR2* 是否參與菸草對疫病菌 *Phytophthora parasitica* 的防禦反應，以 quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) 測量圓葉菸草在接種疫病菌游生子後不同時間的 *NbSIR2* 表現量。接種疫病菌後，菸草植株的外觀在前 12 小時沒有明顯變化，至第 24 小時葉片出現輕微萎凋狀。相較於接種 0 小時，在接種後第 3 小時以及第 6 小時，*NbSIR2* 的表現量上升約 2 倍；接種後 12 小時繼續上升到 4.8 倍；接種後 24 小時，*NbSIR2* 的表現量上升到 11 倍 (圖二)。在接種疫病菌後，*NbSIR2* 的表現量顯著上升意

味著其在植物的防禦反應中起到作用。



4. 純化 ParA1 蛋白

P. parasitica 的 elicitor ParA1 是引發本研究中防禦反應的主角，因此 ParA1 重組蛋白至關重要。ParA1 重組蛋白來源於帶有 pET-20b(+)-ParA1 表現質體之大腸桿菌菌株 *Escherichia coli* C43 (DE)，經大量培養後，以 IPTG 誘導其表現，再經破菌和 Ni-NTA agarose 純化。以 SDS-polyacrylamide gel 分析純化的 ParA1 蛋白 (約 12 KDa) (圖三)：在 IPTG 誘導前，細菌中沒有 ParA1 蛋白 (bacteria before induction)，加入 IPTG 經過 24 小時的誘導表現後破菌並離心分離目標蛋白與破菌後的雜質，上清液富含大量 ParA1 蛋白但也富含其他大小的蛋白 (bacteria disruption supernatant)，沉澱的破菌雜質中有相對很少量的 ParA1 蛋白 (bacteria disruption pellet)，說明破菌較為充分。His-tagged ParA1 經過與 Ni-NTA agarose 的結合作用後，有少量蛋白未能成功被捕捉被直接流出 (unbind)，用從低到高濃度的 imidazole 流洗，逐漸得到純化的 ParA1 蛋白，80 mM imidazole 已經開始流洗出純淨的 ParA1 蛋白，在 100 mM imidazole 流洗時得到最多的 ParA1 重組蛋白。

5. 過表現 *NbSIR2* 之基因加劇 ParA1 蛋白造成之細胞壞疽

為檢視 *NbSIR2* 在 ParA1 引發的免疫反應中的角色，以農桿菌浸潤法在 4.5 週大的菸草葉片的左半部分暫表現 GFP (對照組)，右半部分暫表現 *NbSIR2*-GFP；1 天後，分別收取不同處理的葉片進行 qRT-PCR，發現相較於對照組過表現 GFP 的葉片，過表現 *NbSIR2*-GFP 之葉片的 *NbSIR2* 表

現量顯著提昇 24.8 倍 ($p < 0.01$) (圖四 A)。進一步在葉片上處理 300 nM ParA1 重組蛋白或以 10 mM MES 作為對照組，48 小時之後觀察，發現無論是左半部分暫表現 GFP 的葉片或是右半部分暫表現 *NbSIR2*-GFP 的部分，在處理 MES 後，葉片沒有明顯變化，而處理 ParA1 後兩邊出現了不同程度的壞疽 (圖四 B)。為了比較在暫表現 GFP 和 *NbSIR2*-GFP 後 ParA1 引發的壞疽程度，利用 ImageJ 分別測量 ParA1 的施打面積以及壞疽出現的面積，並計算壞疽程度 (= 壞疽出現的面積 / 施打面積)。發現相較於過表現 GFP 的葉片，ParA1 在過表現 *NbSIR2*-GFP 的葉片所造成的壞疽程度明顯增強 ($p < 0.01$) (圖四 C)，顯示 *NbSIR2*-GFP 參與 ParA1 引發植物細胞壞疽的過程。

6. 靜默 *NbSIR2* 之基因表現緩解 ParA1 蛋白造成之細胞壞疽


另一方面，也通過降低 *NbSIR2* 的基因表現量去瞭解 *NbSIR2* 是否會影響 ParA1 引起的植物防禦反應。在 2.5 週大的圓葉菸草幼苗運用 Tobacco rattle virus (TRV)-mediated gene silencing 技術靜默 *NbSIR2* 的表現，並以處理 TRV-GFP 為對照組；3 週後收集葉片以 qRT-PCR 分析 *NbSIR2* 的表現量，發現相較於處理 TRV-GFP 的對照組植株，TRV-SIR2 靜默植株的 *NbSIR2* 基因表現量降低至 45% ($p < 0.01$) (圖五 A)。進一步在基因靜默植株葉片處理 300 nM ParA1 蛋白或處理 10 mM MES 以作為對照組，兩天後發現無論是處理 TRV-GFP 的對照組植株或是 TRV-SIR2 的靜默植株，均出現了壞疽斑 (圖五 B)。在利用 Image J 測量並計算壞疽程度後，發現 *NbSIR2* 靜默植株的壞疽程度與對照組相比，顯著減輕 ($p < 0.01$) (圖五 C)。

這些結果說明了 *NbSIR2* 在 ParA1 引發的免疫反應中起到正調控的作用。



7. *NbSIR2*-GFP 分佈在內質網膜上


為瞭解 *NbSIR2* 在植物細胞的分佈情形，以農桿菌浸潤法在 4 週大的圓葉菸草葉片暫表現 *NbSIR2*-GFP，44 小時後於共軛焦螢光顯微鏡 (Zeiss LSM 880) 觀察。從細胞表層觀察時 *NbSIR2*-GFP 的綠色螢光訊號呈現為遍佈於細胞的分佈，但並不均勻，有的位置存在但有的位置空缺；在細胞中心層時則呈現出清晰的細胞輪廓，但並不是平滑均勻的線條，而是存在間斷且亮度變化的線條 (圖六 A)。由於 *NbSIR2*-GFP 在植物細胞中單獨表現的情形非常貼近 ER 的分佈情形 (Li, et al., 2021)，於是進一步將 *NbSIR2*-GFP 與原生質膜標記蛋白 *Arabidopsis thaliana* ACA8-mCherry 或內質網標記蛋白 mCherry-KDEL 共同表現，並觀察綠色螢光與紅色螢光的分佈情形。與 *AtACA8*-mCherry 共表現時，在細胞表層 *AtACA8*-mCherry 的紅色螢光訊號呈密集地一個個小點組成一片狀的分佈，*NbSIR2*-GFP 的綠色螢光訊號雖然也是由點組成的片狀，但當與 *AtACA8*-mCherry 的紅色螢光疊合時，二者的分佈沒有完全重疊，沿著圖中白色箭頭方向對綠色和紅色螢光進行強度測量，發現二者的螢光強度走勢不一致。在細胞中間層，*AtACA8*-mCherry 的紅色螢光是亮度均勻的線形，*NbSIR2*-GFP 的綠色螢光訊號也呈線型但不均勻，當兩者疊在一起時，綠色螢光訊號會出現在紅色螢光訊號線條之左右，沿著圖中白色箭頭方向對兩種螢光的強度測量顯示，二者的走勢相似但是有距離上的偏移，且紅色螢光訊號的峰值相近，而綠色螢光訊號的峰值有差異，以上結果說明 *NbSIR2*-GFP 的不均勻分佈且與原生質膜的關係呈現貼近但



不重疊的狀態 (圖六 B)。內質網膜標記蛋白 mCherry-KDEL 之紅色螢光訊號在細胞表層是不均勻地分佈，有的地方是密集的點狀，有的地方則沒有訊號，在細胞中間層則是可以看到細胞輪廓的線條，但是亮度時強時弱。從細胞表層和細胞中間層觀察 mCherry-KDEL 之紅色螢光訊號與 *NbSIR2*-GFP 之綠色螢光訊號都有大部分的重疊。在細胞表層跟細胞中間層的兩個白色箭頭方向上的訊號強度分析均顯示，二者的螢光訊號強度具有同樣的趨勢，甚至峰值的大小也成正比 (圖六 C)。從胺基酸序列上，*NbSIR2* 被預測為 LRR-RLP 並且在 transmembrane domain 後具有 ER retention signal (KKxx)：第 802-805 個胺基酸序列為 KKLT。綜上，*NbSIR2*-GFP 不像其他大部分 RLP 一樣分佈在植物細胞膜上，而是會不均勻地以 Type I 的形式 (N 端朝向內質網內腔，C 端朝向細胞質) 嵌在植物細胞的內質網膜上 (Shao and Hegde, 2011)。

8. *NbSIR2* 與 *NbSOBIR1* 之交互作用

NbSIR2 最初被發現是因為它在 ParA1 的處理下與 *SISOBIR1* 有交互作用。為驗證兩者的交互作用，在 *N. benthamiana* 以農桿菌浸潤法表現相應蛋白後，以蛋白共免疫沉澱法 (Co-IP) 及西方墨點實驗 (western blot) 偵測蛋白的存在情形。實驗共有五個處理，單獨表現 *NbSOBIR1*-mCherry、對照組共表現 *NbSOBIR1*-mCherry 和 TAP、單獨表現 *NbSIR2*-TAP、實驗組共表現 *NbSOBIR1*-mCherry 和 *NbSIR2*-TAP 以及對照組共表現 VAP2-1-mCherry 和 *NbSIR2*-TAP。菸草葉片的蛋白粗抽液 (input) 同 IgG Sepharose (捕捉 TAP-tagged 蛋白) 免疫沉澱後之 pulled-down 均以西方墨點法用 anti-



mCherry 抗體和 PAP 抗體 (偵測 TAP-tagged protein) 偵測相應蛋白的存在情形 (圖七)。結果可以看到在 input 中，單獨或共同表現的 *NbSOBIR1*-mCherry、VAP27-1-mCherry 和 *NbSIR2*-TAP 都能被偵測到，*NbSIR2*-TAP 在 ExPASy 預測分子量約為 110 KDa，其主條帶位於 100 KDa 與 140 KDa 之間，在 100 KDa 附近有副條帶，推測為 *NbSIR2*-TAP 的降解產物，根據蛋白在 SDS-polyacrylamide gel 之位移與分子量之函數關係計算其主條帶之蛋白實際大小約為 124 KDa，但是在 ExPASy FindMod tool 預測 *NbSIR2* 沒有已知的轉譯後修飾。在 pulled-down 中，*NbSIR2*-TAP 被富集而大量存在，導致結合過多的抗體後高濃度 HRP 把 HRP-substrate 耗盡的情形因而條帶出現了反白現象。以 anti-mCherry 抗體去偵測 pulled-down 時，只有共表現 *NbSOBIR1*-mCherry 和 *NbSIR2*-TAP 的實驗組偵測到了蛋白，即 *NbSIR2*-TAP 與 *NbSOBIR1*-mCherry 具交互作用，並且此交互作用在未處理 elicitor 的情形下也可發生。

9. ParA1 在菸草引發活性氧化物的累積

活性氧化物的累積是植物重要防禦反應之一，為探究 *NbSIR2* 是否參與 ParA1 引發的活性氧化物的累積，從過表現 *NbSIR2*-GFP (或對照組過表現 GFP) 之菸草葉片製備 leaf discs，處理 ParA1 重組蛋白後立即偵測活性氧化物生成情形。對照組過表現 GFP 的葉片在 ParA1 的刺激下明顯產生活性氧化物並且在第 12 分鐘達到峰值，在實驗全長一小時內，只有觀察到一次活性氧化物的爆發。從峰值來看，過表現 *NbSIR2*-GFP 的葉片之活性氧化物爆發量略強於對照組過表現 GFP 的葉片 (圖八 A)，但是對一小時

內的活性氧化物累積總量進行分析發現過表現 *NbSIR2-GFP* 與對照組無顯著差異 (圖八 B)。



四、 討論




1. *NbSIR2* 位於 ER membrane

對 *NbSIR2* 的胺基酸序列分析顯示 *NbSIR2* 是一個含有 817 個胺基酸的跨膜蛋白，N 端具有 LRR domain，第 772-779 個胺基酸構成 transmembrane domain，在之後的第 802-805 個胺基酸序列為內質網膜蛋白保守性序列 KKLT，之後是一小段 cytoplasmic tail (圖一)。通過共軛焦螢光顯微鏡觀察發現 *NbSIR2*-GFP 與內質網標記蛋白 mCherry-KDEL 的螢光訊號分佈重疊。綜合以上分析與觀察，推測 *NbSIR2* 以 Type I topology (N 端朝向 ER lumen，C 端朝向 cytosol) 嵌在植物細胞的內質網膜上 (Shao and Hegde, 2011)。面向內質網內腔的 LRR domain 是否參與 *NbSIR2* 辨識某些 ER 蛋白尚未知曉，但靠近 C 端的第 781-783 的胺基酸具有 SOBIR1-interacting motif GxxxG (Bi et al., 2016；此位點是 SOBIR1 與 RLP 結合之位點) 為 *NbSIR2* 與 *NbSOBIR1* 的交互作用提供了基礎，可能涉及 *NbSIR2* 調控的從內質網向細胞質訊號傳遞。

2. *NbSIR2* 與 *NbSOBIR1* 具有交互作用


SOBIR1 是植物免疫反應中的 adaptor kinase，為 LRR-RLP PRRs 如 Cf-4 和 Vel 結合提供 kinase 功能，參與其調控的植物免疫反應 (Liebrand et al., 2013)。ELR 對疫病菌 elicitors 的辨識也需要 SOBIR1 的參與，並且 ELR 與 SOBIR1 的複合體固定存在，二者的結合不會因為 elicitors (INF1) 的刺激而增強。*NbSIR2* 被預測為 LRR-RLP，與 *NbSOBIR1* 也存在交互作用 (圖七)，但是 ParA1 對二者的結合是否造成影響尚待研究。LRR-RLP 與 SOBIR1 的複合體依靠二者穿膜



區的 GxxxG motif (Bi et al., 2016), *NbSIR2* 在第 781-783 的胺基酸為 GFPPG, 推測與 *NbSOBIR1* 的交互作用相關, 若想進一步證實此相關性, 未來可以對 *NbSIR2* 之 GxxxG motif 做突變, 再分析其與 *NbSOBIR1* 之交互作用。
NbSOBIR1 會在原生質膜形成跟隨內質網動態變化的 microdomains, 而且處理 ParA1 elicitor 導致 *NbSOBIR1* 從原生質膜向胞內移動 (Peng et al., 2015)。過表現與 *NbSOBIR1* 有交互作用的內質網膜蛋白 *NbRLP1* 會促進 ParA1 所引發之 *NbSOBIR1* 移動, 顯示 *NbRLP1* 參與 *SOBIR1* 相關之免疫反應 (Li et al., 2021)。*NbSIR2* 與 *NbRLP1* 同為與 *NbSOBIR1* 有交互作用的內質網膜蛋白且參與 ParA1 引發的細胞壞疽, 因而 *NbSIR2* 對 *NbSOBIR1* microdomains 在免疫反應中的影響非常值得深入探究。*NbSIR2* 與 *NbSOBIR1* *in vitro* 的交互作用同時提出一個疑問: 一個內質網膜蛋白與一個原生質膜蛋白是如何近距離接觸的? 內質網膜與細胞膜接觸點 (ER-plasma membrane contact site, EPCS) 是一個可能, 近期對植物 EPCS 的研究發現其不僅參與脂質運輸與調控 Ca^{2+} 平衡, 也參與調控生物刺激 (Wang et al., 2017; Wang et al., 2014)。

3. *NbSIR2* 參與 ParA1 引發的免疫反應

ParA1 是疫病菌 *P. parasitica* 產生的 elicitors, 在圓葉菸草上, 以 agroinfiltration 過表現 *NbSIR2* 會增加 ParA1 重組蛋白引起的細胞死亡 (圖四), 以 virus-induced gene silencing 降低 *NbSIR2* 的表現量會緩解 ParA1 重組蛋白引起的細胞死亡 (圖五), 根據以上結果, 推測 *NbSIR2* 參與 ParA1 引發的細胞壞疽。在檢測 ParA1 引發的 ROS 反應實驗中, 在加入 ParA1 elicitor 後的 12 分鐘, 活性氧分子出現第一個爆發, 但是實驗全長的一小時內對活性氧分子累積量的比較,



過表現 *NbSIR2*-GFP 的菸草葉片與對照組過表現 GFP 的菸草葉片沒有顯著差異。Elicitins 誘發的過敏性細胞死亡 (HR cell death) 被認為是發生在 elicitin 刺激兩小時以後的第二次活性氧化物累積的結果 (Mur et al., 2008; Chaparro-Garcia et al., 2011)。因此，*NbSIR2* 在 ParA1 引發的免疫反應中所扮演的角色很可能與第二次活性氧化物的累積相關，遺憾的是本研究中 ROS 反應的測量時長不足，沒有觀察到第二次活性氧化物的爆發，或許需要拉長測量時長至三或四小時。Adachi et al (2015) 的研究顯示 *N. benthamiana* 辨識 INF elicitin 後引發 MAPK cascades 的活化，磷酸化 transcription factors WRKY 7/8/9/11 之後，這些 WRKYs 與 RBOHB (orthologs of *Arabidopsis* RBOHD in *N. benthamiana*) promoter 之 W-box 結合，提高其表現量進而引發第二次活性氧化物之累積 (Adachi et al., 2015)。至於 *NbSIR2* 是如何參與植物第二次活性氧化物的累積，值得研究。另，Chaparro-Garcia et al 的研究發現 INF1 elicitin 與 flg-22 引發的 ROS 反應雖然最後的活性氧化物總累積量相近，但是動力學上具有很大差異：flg-22 引發的 ROS 反應很典型，很快就達到了第一次活性氧化物的爆發並且明顯強於第二次；INF1 引發的兩次活性氧化物的爆發發生較晚 (第一次爆發在處理 INF1 後的第 50 分鐘，第二次在第 135 分鐘) 且峰值相近，遠小於 flg-22 引發的第一次活性氧化物的累積 (Chaparro-Garcia et al., 2011)。本研究中 ParA1 引發之 ROS 的反應，強度較弱且在一小時內只有第一次活性氧化物的爆發，推測與同為 elicitin 的 INF1 引發的 ROS 反應之動力學相近，對未來的研究有參考價值。

4. 結語

本研究選取與 *S/SOBIR1* 有交互作用的圓葉菸草 LRR-RLP 進行研究，命名為

NbSIR2，在接種疫病菌後其表現量明顯上升，其功能性分析顯示其參與 ParA1 elicitor 引發的細胞壞疽。*NbSIR2* 位於內質網膜並且與位於原生質膜的 *NbSOBIR1* 存在交互作用。針對植物內質網膜蛋白的研究甚少，本研究對內質網膜蛋白參與植物的免疫反應提供了一個研究方向，其中有更多機制亟待探索。



References

- Adachi, H., Nakano, T., Miyagawa, N., Ishihama, N., Yoshioka, M., Katou, Y., Yaeno, T., Shirasu, K., and Yoshioka, H. 2015. WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 27:2645-2663.
- Armstrong, M. R., Whisson, S. C., Pritchard, L., Bos, J. I., Venter, E., Avrova, A. O., Rehmany, A. P., Böhme, U., Brooks, K., and Cherevach, I. 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:7766-7771.
- Bi, G., Liebrand, T. W., Bye, R. R., Postma, J., van der Burgh, A. M., Robatzek, S., Xu, X., and Joosten, M. H. 2016. SOBIR1 requires the GxxxG dimerization motif in its transmembrane domain to form constitutive complexes with receptor-like proteins. *Mol. Plant Pathol.* 17:96-107.
- Bisceglia, N. G., Gravino, M., and Savatin, D. V. 2015. Luminol-based assay for detection of immunity elicitor-induced hydrogen peroxide production in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Bio-protocol* 5:e1685-e1685.
- Block, A., Toruño, T. Y., Elowsky, C. G., Zhang, C., Steinbrenner, J., Beynon, J., and Alfano, J. R. 2014. The *Pseudomonas syringae* type III effector Hop D 1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and targets the *Arabidopsis* transcription factor NTL 9. *New Phytol.* 201:1358-1370.
- Boissy, G., de La Fortelle, E., Kahn, R., Huet, J.-C., Bricogne, G., Pernollet, J.-C., and Brunie, S. 1996. Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure.* 4:1429-1439.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:379-406.
- Bonza, M. C., Morandini, P., Luoni, L., Geisler, M., Palmgren, M. G., and De Michelis, M. I. 2000. *At-ACA8* encodes a plasma membrane-localized calcium-ATPase of *Arabidopsis* with a calmodulin-binding domain at the N terminus. *Plant Physiol.* 123:1495-1506.
- Bos, J. I., Armstrong, M. R., Gilroy, E. M., Boevink, P. C., Hein, I., Taylor, R. M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R. R., and Harrower, B. 2010. *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:9909-9914.
- Bos, J. I., Kanneganti, T. D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M. R., Birch, P. R., and Kamoun, S. 2006. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 48:165-176.
- Brandizzi, F., Hanton, S., DaSilva, L. L. P., Boevink, P., Evans, D., Oparka, K., Denecke, J., and Hawes, C. 2003. ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J.* 34:269-281.

- Chang, Y. H., Yan, H. Z., and Liou, R. F. 2015. A novel elicitor protein from *Phytophthora parasitica* induces plant basal immunity and systemic acquired resistance. *Mol. Plant Pathol.* 16:123-136.
- Chaparro-Garcia, A., Schwizer, S., Sklenar, J., Yoshida, K., Petre, B., Bos, J. I., Schornack, S., Jones, A. M., Bozkurt, T. O., and Kamoun, S. 2015. *Phytophthora infestans* RXLR-WY effector AVR3a associates with dynamin-related protein 2 required for endocytosis of the plant pattern recognition receptor FLS2. *PLoS One* 10. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137071>
- Chaparro-Garcia, A., Wilkinson, R. C., Gimenez-Ibanez, S., Findlay, K., Coffey, M. D., Zipfel, C., Rathjen, J. P., Kamoun, S., and Schornack, S. 2011. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is required for basal resistance against the late blight pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* 6. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016608>
- Cook, D. E., Mesarich, C. H., and Thomma, B. P. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:541-563.
- Couto, D., and Zipfel, C. 2016. Regulation of pattern recognition receptor signaling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* 16:537.
- Derevnina, L., Dagdas, Y. F., De la Concepcion, J. C., Bialas, A., Kellner, R., Petre, B., Domazakis, E., Du, J., Wu, C. H., and Lin, X. 2016. Nine things to know about elicitors. *New Phytol.* 212:888-895.
- Dokládál, L., Obořil, M., Stejskal, K., Zdráhal, Z., Ptáčková, N., Chaloupková, R., Damborský, J., Kašparovský, T., Jeandroz, S., and Žd'árská, M. 2012. Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *J. Exp. Bot.* 63:2203-2215.
- Domazakis, E., Wouters, D., Lochman, J., Visser, R. G., Joosten, M. H., and Vleeshouwers, V. G. 2020. ELR is a true pattern recognition receptor that associates with elicitors from diverse *Phytophthora* species. *BioRxiv*. Doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.21.305813>
- Domazakis, E., Wouters, D., Visser, R. G., Kamoun, S., Joosten, M. H., and Vleeshouwers, V. G. 2018. The ELR-SOBIR1 complex functions as a two-component receptor-like kinase to mount defense against *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 31:795-802.
- Du, J., Verzaux, E., Chaparro-Garcia, A., Bijsterbosch, G., Keizer, L. P., Zhou, J., Liebrand, T. W., Xie, C., Govers, F., and Robatzek, S. 2015. Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nat. Plants.* 1:1-5.
- Dunyak, B. M., and Gestwicki, J. E. 2016. Peptidyl-Proline Isomerases (PPIases): Targets for natural products and natural product-inspired compounds: miniperspective. *J. Med. Chem.* 59:9622-9644.
- El-Kharbotly, A., Leonards-Schippers, C., Huigen, D., Jacobsen, E., Pereira, A., Stiekema, W., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1994. Segregation analysis and RFLP mapping of the R1 and R3 alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of dihaploid potato parents. *Mol. Gen. Genet.* 242:749-754.

- Fan, G., Yang, Y., Li, T., Lu, W., Du, Y., Qiang, X., Wen, Q., and Shan, W. 2018. A *Phytophthora capsici* RXLR effector targets and inhibits a plant PPIase to suppress endoplasmic reticulum-mediated immunity. *Mol. Plant*. 11:1067-1083.
- Fawke, S., Doumane, M., and Schornack, S. 2015. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79:263-280.
- Gao, M., Wang, X., Wang, D., Xu, F., Ding, X., Zhang, Z., Bi, D., Cheng, Y. T., Chen, S., and Li, X. 2009. Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in *Arabidopsis*. *Cell Host Microbe*. 6:34-44.
- Gust, A. A., and Felix, G. 2014. Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21:104-111.
- Gust, A. A., Pruitt, R., and Nürnberger, T. 2017. Sensing danger: key to activating plant immunity. *Trends Plant Sci.* 22:779-791.
- Hendrix, J. 1970. Sterols in growth and reproduction of fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 8:111-130.
- Hong, B., Ichida, A., Wang, Y., Scott Gens, J., Pickard, B. G., and Harper, J. F. 1999. Identification of a calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase in the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 119:1165-1176.
- Howell, S. H. 2013. Endoplasmic reticulum stress responses in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:477-499.
- Jehle, A. K., Fürst, U., Lipschis, M., Albert, M., and Felix, G. 2013. Perception of the novel MAMP eMax from different *Xanthomonas* species requires the *Arabidopsis* receptor-like protein ReMAX and the receptor kinase SOBIR. *Plant Signal. Behav.* 8:e27408.
- Jiang, R. H., Tyler, B. M., Whisson, S. C., Hardham, A. R., and Govers, F. 2006. Ancient origin of elicitor gene clusters in *Phytophthora* genomes. *Mol. Biol. Evol.* 23:338-351.
- Jing, M., and Wang, Y. 2020. Plant pathogens utilize effectors to hijack the host endoplasmic reticulum as part of their infection strategy. *Engineering*. 6:500-504.
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J., Roy, S. G., Schena, L., Zambounis, A., and Panabières, F. 2015. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant. Pathol.* 16:413-434.
- Kamoun, S., Klucher, K. M., Coffey, M. D., and Tyler, B. M. 1993. A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:573-573.
- Kanyuka, K., and Rudd, J. J. 2019. Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. *Curr. Opin. Plant. Bio.* 50:1-8.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. 2002. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7:193-195.
- Ko, W.-H. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:57-73.
- Kong, G., Zhao, Y., Jing, M., Huang, J., Yang, J., Xia, Y., Kong, L., Ye, W., Xiong, Q., and Qiao, Y. 2015. The activation of *Phytophthora* effector Avr3b by plant

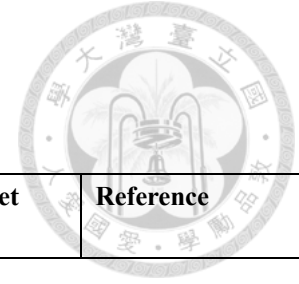
- cyclophilin is required for the nudix hydrolase activity of Avr3b. *PLoS Pathog.* 11:e1005139. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005139>
- Lacaze, A., and Joly, D. L. 2020. Structural specificity in plant–filamentous pathogen interactions. *Mol. Plant Pathol.* 21:1513-1525.
- Larroque, M., Belmas, E., Martinez, T., Vergnes, S., Ladouce, N., Lafitte, C., Gaulin, E., and Dumas, B. 2013. Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity and resistance to the root pathogen *Phytophthora parasitica* in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 64:3615-3625.
- Leslie, M. E., Lewis, M. W., Youn, J.-Y., Daniels, M. J., and Liljegren, S. J. 2010. The EVERSHED receptor-like kinase modulates floral organ shedding in *Arabidopsis*. *Development* 137:467-476.
- Li, J., Zhao-Hui, C., Batoux, M., Nekrasov, V., Roux, M., Chinchilla, D., Zipfel, C., and Jones, J. D. 2009. Specific ER quality control components required for biogenesis of the plant innate immune receptor EFR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:15973-15978.
- Li, Y.-H., Ke, T.-Y., Shih, W.-C., Liou, R.-F., and Wang, C.-W. 2021. *Nb*SOBIR1 partitions into plasma membrane microdomains and binds ER-Localized *Nb*RPLP1. *Front. Plant Sci.* 1813. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721548>
- Liebrand, T. W., van den Berg, G. C., Zhang, Z., Smit, P., Cordewener, J. H., America, A. H., Sklenar, J., Jones, A. M., Tameling, W. I., and Robatzek, S. 2013. Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:10010-10015.
- Liebrand, T. W., van den Burg, H. A., and Joosten, M. H. 2014. Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. *Trends Plant Sci.* 19:123-132.
- Liu, J. X., and Howell, S. H. 2016. Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytol.* 211:418-428.
- Luo, L. 2012. Plant cytokine or phyto cytokine. *Plant Signal. Behav.* 7:1513-1514.
- McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., Whisson, S. C., Beynon, J. L., and Birch, P. R. 2013. An RxLR effector from *Phytophthora infestans* prevents re-localisation of two plant NAC transcription factors from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *PLoS Pathog.* 9:e1003670. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003670>
- Mikes, V., Milat, M.-L., Ponchet, M., Panabières, F., Ricci, P., and Blein, J.-P. 1998. Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 245:133-139.
- Mokryakova, M., Pogorelko, G., Bruskin, S., Piruzian, E., and Abdeeva, I. 2014. The role of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase genes of *Arabidopsis thaliana* in plant defense during the course of *Xanthomonas campestris* infection. *Russ. J. Genet.* 50:140-148.
- Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., and Prats, E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59:501-520.

- Na, R., Yu, D., Qutob, D., Zhao, J., and Gijzen, M. 2013. Deletion of the *Phytophthora sojae* avirulence gene Avr1d causes gain of virulence on Rps1d. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26:969-976.
- Nelson, B. K., Cai, X., and Nebenführ, A. 2007. A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J.* 51:1126-1136.
- Oldroyd, G. E. 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:252-263.
- Panabieres, F., Marais, A., Le Berre, J.-Y., Penot, I., Fournier, D., and Ricci, P. 1995. Characterization of a gene cluster of *Phytophthora cryptogea* which codes for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8:996-1003.
- Peng, K.-C., Wang, C.-W., Wu, C.-H., Huang, C.-T., and Liou, R.-F. 2015. Tomato SOBIR1/EVR homologs are involved in elicitor perception and plant defense against the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28:913-926.
- Pogorelko, G. V., Mokryakova, M., Fursova, O. V., Abdeeva, I., Piruzian, E. S., and Bruskin, S. A. 2014. Characterization of three *Arabidopsis thaliana* immunophilin genes involved in the plant defense response against *Pseudomonas syringae*. *Gene* 538:12-22.
- Postma, J., Liebrand, T. W., Bi, G., Evrard, A., Bye, R. R., Mbengue, M., Kuhn, H., Joosten, M. H., and Robatzek, S. 2016. Avr4 promotes Cf-4 receptor-like protein association with the BAK1/SERK3 receptor-like kinase to initiate receptor endocytosis and plant immunity. *New Phytol.* 210:627-642.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J. C., Sallantin, M., Beauvais-cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., and Pernollet, J. C. 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* 183:555-563.
- Shan, W., Cao, M., Leung, D., and Tyler, B. M. 2004. The Avr1b locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps1b. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:394-403.
- Shao, S., and Hegde, R. S. 2011. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:25.
- Shi, W. C. 2017. The role of NbRLP1 in response of *Nicotiana benthamiana* to the elicitor ParA1. Master thesis. National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- Srivastava, R., Deng, Y., Shah, S., Rao, A. G., and Howell, S. H. 2013. BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:1416-1429.
- Stong, R. A., Kolodny, E., Kelsey, R. G., González-Hernández, M., Vivanco, J. M., and Manter, D. K. 2013. Effect of plant sterols and tannins on *Phytophthora ramorum* growth and sporulation. *J. Chem. Ecol.* 39:733-743.
- Stornaiuolo, M., Lotti, L. V., Borgese, N., Torrisi, M.-R., Mottola, G., Martire, G., and Bonatti, S. 2003. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter

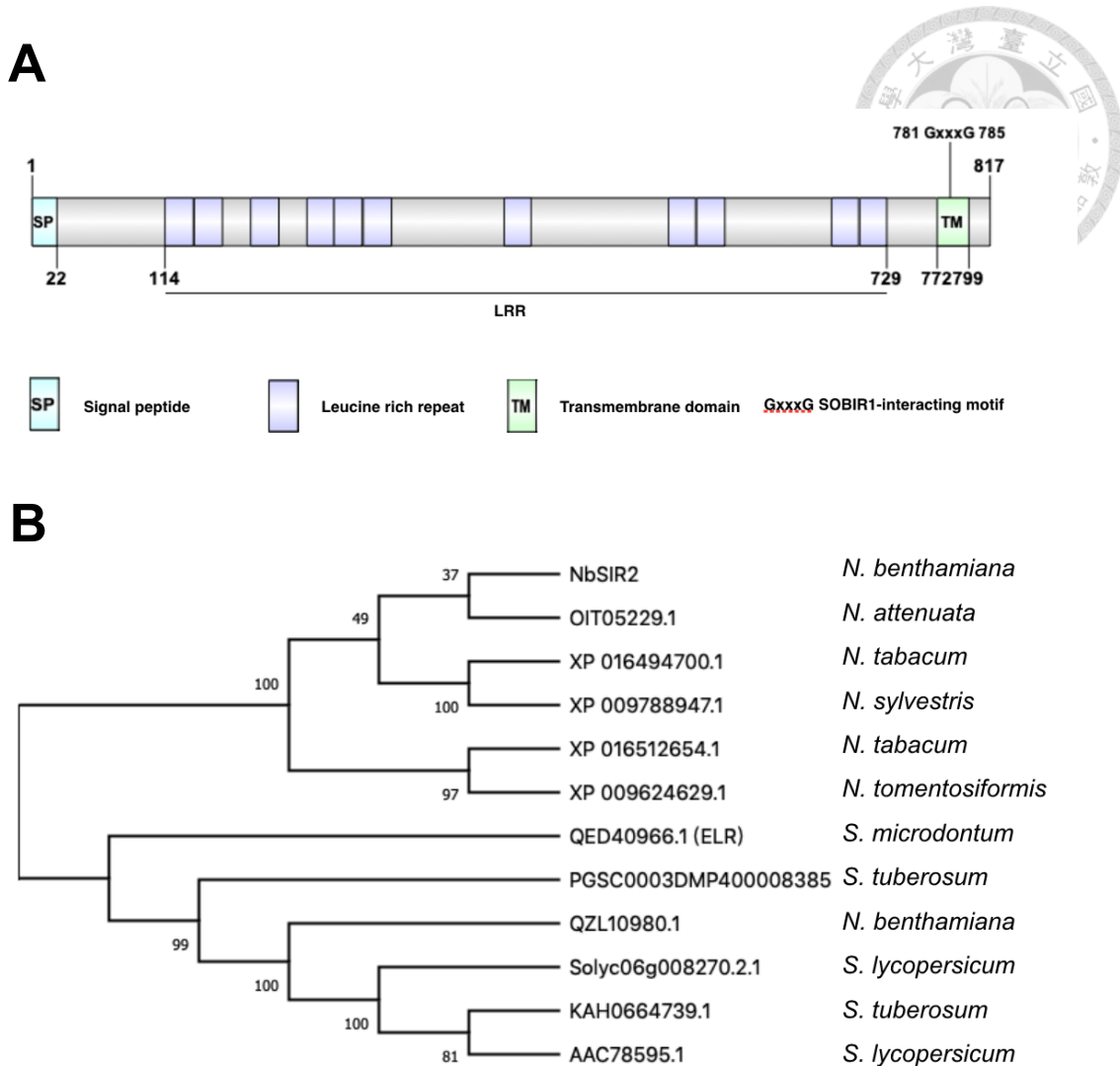
- protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Mol. Biol. Cell.* 14:889-902.
- Thomma, B. P., Nürnberger, T., and Joosten, M. H. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23:4-15.
- Van Der Burgh, A. M., Postma, J., Robatzek, S., and Joosten, M. H. 2019. Kinase activity of SOBIR1 and BAK1 is required for immune signalling. *Mol. Plant Pathol.* 20:410-422.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. 2003. Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33:949-956.
- Wallis, J. G., and Browse, J. 2010. Lipid biochemists salute the genome. *Plant J.* 61:1092-1106.
- Wang, P., Hawes, C., and Hussey, P. J. 2017. Plant endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites. *Trends Plant Sci.* 22:289-297.
- Wang, P., Hawkins, T. J., Richardson, C., Cummins, I., Deeks, M. J., Sparkes, I., Hawes, C., and Hussey, P. J. 2014. The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Curr. Biol.* 24:1397-1405.
- Wang, Y., Xu, Y., Sun, Y., Wang, H., Qi, J., Wan, B., Ye, W., Lin, Y., Shao, Y., and Dong, S. 2018. Leucine-rich repeat receptor-like gene screen reveals that *Nicotiana* RXEG1 regulates glycoside hydrolase 12 MAMP detection. *Nat. Commun.* 9:1-12.
- Xu, G., Li, S., Xie, K., Zhang, Q., Wang, Y., Tang, Y., Liu, D., Hong, Y., He, C., and Liu, Y. 2012. Plant ERD2-like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity. *Plant J.* 72:57-69.
- Yang, X., Tyler, B. M., and Hong, C. 2017. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA fungus.* 8:355.
- Ye, C., Dickman, M. B., Whitham, S. A., Payton, M., and Verchot, J. 2011. The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein. *Plant Physiol.* 156:741-755.
- Zhang, L., Kars, I., Essenstam, B., Liebrand, T. W., Wagemakers, L., Elberse, J., Tagkalaki, P., Tjoitang, D., van den Ackerveken, G., and van Kan, J. A. 2014. Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the *Arabidopsis* receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES1. *Plant Physiol.* 164:352-364.
- Zhang, W., Fraiture, M., Kolb, D., Löffelhardt, B., Desaki, Y., Boutrot, F. F., Tör, M., Zipfel, C., Gust, A. A., and Brunner, F. 2013. *Arabidopsis* receptor-like protein30 and receptor-like kinase suppressor of BIR1-1/EVERSHED mediate innate immunity to necrotrophic fungi. *Plant Cell* 25:4227-4241.
- Zheng, X.-y., Zhou, M., Yoo, H., Pruneda-Paz, J. L., Spivey, N. W., Kay, S. A., and Dong, X. 2015. Spatial and temporal regulation of biosynthesis of the plant immune signal salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:9166-9173.
- Zipfel, C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35:345-351.

Table

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study



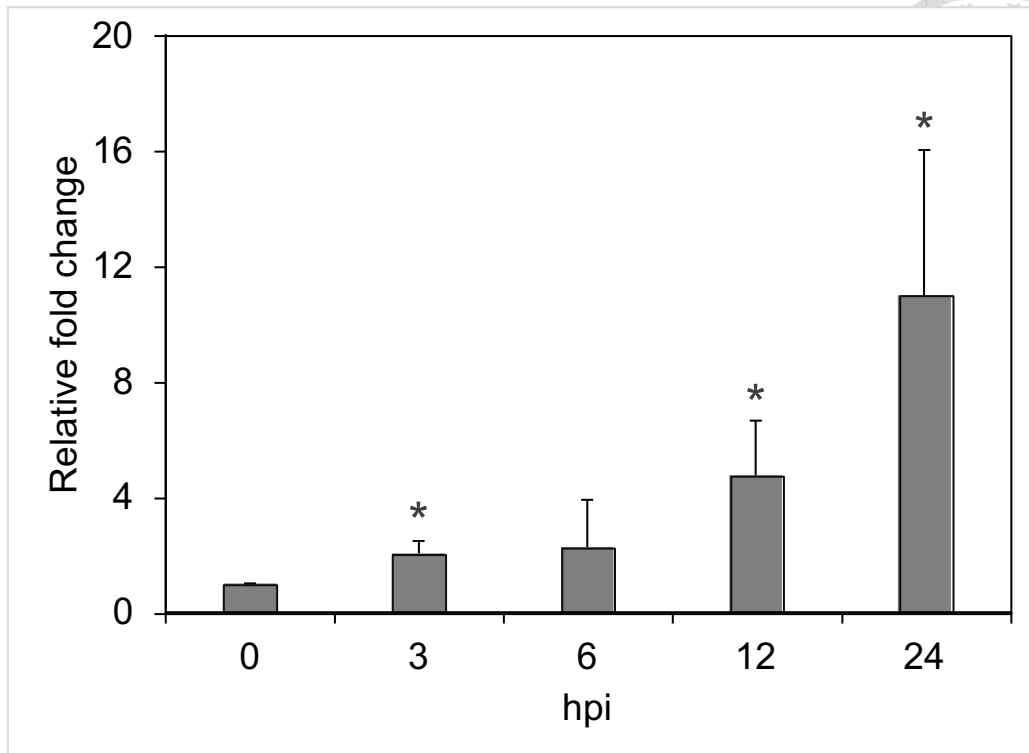
Primer name	Sequence (5' → 3')	Target gene	Reference
For qRT-PCR			
NbSIR2-qF1	AACCATGCCTACTGCTCCTTTTCAC	<i>NbSIR2</i>	This study
NbSIR2-qR1	AACAATCGGAGGCGGAATTCCA	<i>NbSIR2</i>	This study
NbEF1 α -qF1	TGAGATGCACCACGAAGCTC	<i>NbEF1α</i>	Chang et al., 2015
NbEF1 α -qR1	TGAGATGCACCACGAAGCTC	<i>NbEF1α</i>	Chang et al., 2015
For plasmid construction			
NbSIR2-cds-F1	TGAGATGCACCACGAAGCTC	<i>NbSIR2</i>	This study
NbSIR2-cds-R1	GTTGCGAGCGCGCCTTCTTAGGAG	<i>NbSIR2</i>	This study
NbSIR2-si-F1	GAAGCTTGATGACAACCTTCTTGGTGG	<i>NbSIR2</i>	This study
NbSIR2-si-R1	CACCGAAGGAATCTCTCCAGTAAGCATATTGTT	<i>NbSIR2</i>	This study



圖一、*NbSIR2* 之結構預測與親緣關係分析

Figure 1. Structure prediction and phylogenetic analysis of *NbSIR2*.

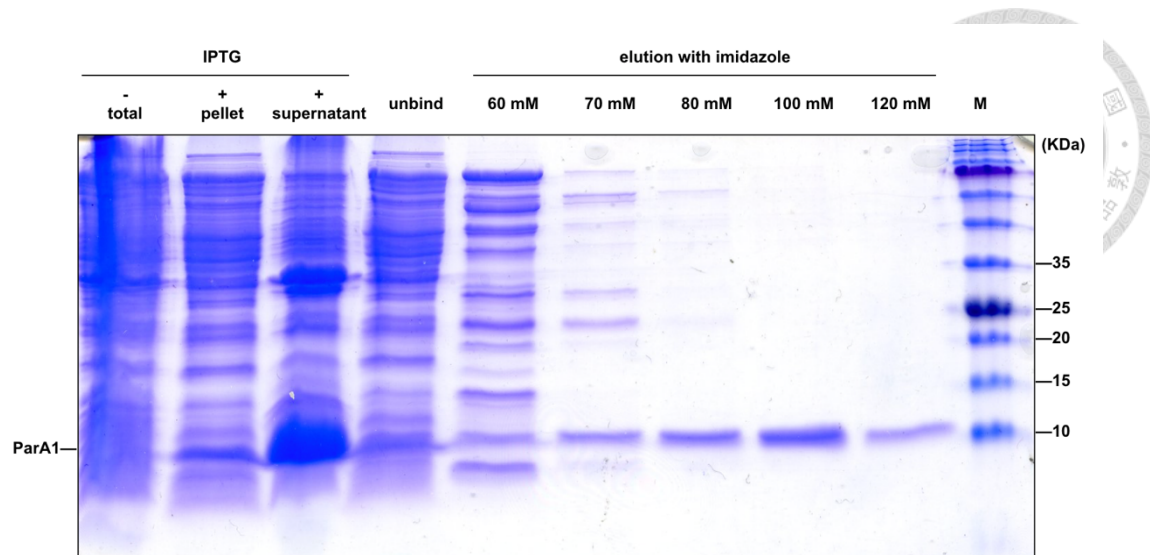
A. Predicted protein structure of *NbSIR2*. Conserved domains were predicted by using InterPro. **B.** Phylogenetic analysis of *NbSIR2*. Multiple sequence alignment of *NbSIR2* and its homologues from other Solanaceae plants retrieved from the protein database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) was performed by using Clustal Omega. The phylogenetic tree was then constructed by using the maximum likelihood method and branch support was evaluated with 1,000 bootstrap pseudoreplicates on MEGAX.



圖二、接種 *Phytophthora parasitica* 顯著提高 *NbSIR2* 的表現量

Figure 2. *Phytophthora parasitica* infection induced the expression of *NbSIR2*.

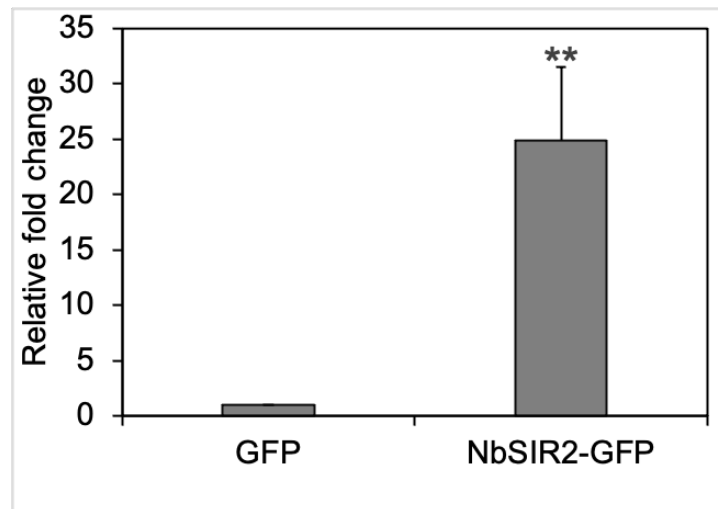
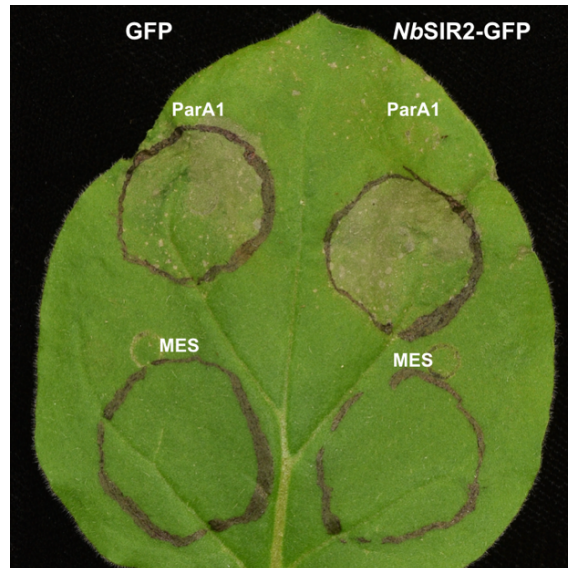
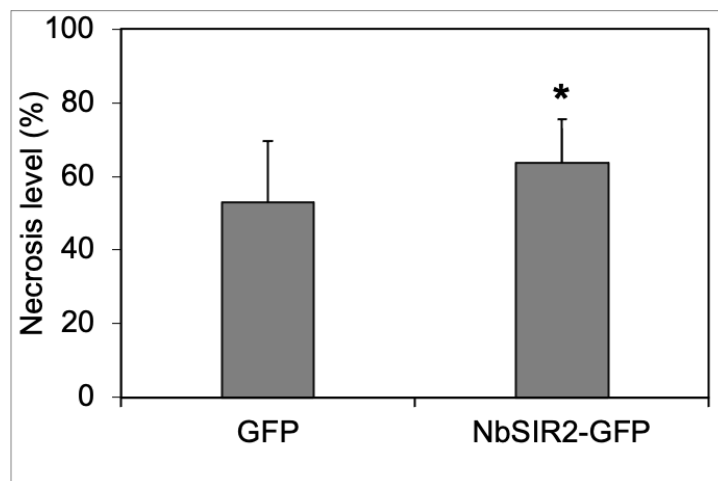
At the indicated hours post inoculation (hpi) of *P. parasitica* zoospores on 4.5-week-old *Nicotiana benthamiana*, plant total RNAs were isolated and analyzed by qRT-PCR. The experiments were repeated three times. Raw data for *NbSIR2* was normalized by using the transcript level of *NbEF-1 α* as an internal control and expressed as mean fold change (\pm SD) relative to the expression at 0 hpi. Asterisks indicate significant difference based on the Student's *t*-test (* $p < 0.05$).



圖三、以 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 分析 ParA1 重組蛋白

Figure 3. Analysis of ParA1 recombinant protein by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Escherichia coli C43 (DE) harboring pET-20b(+)-ParA1 was grown in terrific broth and protein expression was induced by adding IPTG. His-tagged ParA1 recombinant proteins were purified with the use of Ni-NTA agarose and then eluted by using different concentrations of imidazole. Protein fractions from each step were analyzed by 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by Coomassie blue stain. M: protein molecular weight markers (Smobio, Hsinchu City, Taiwan).

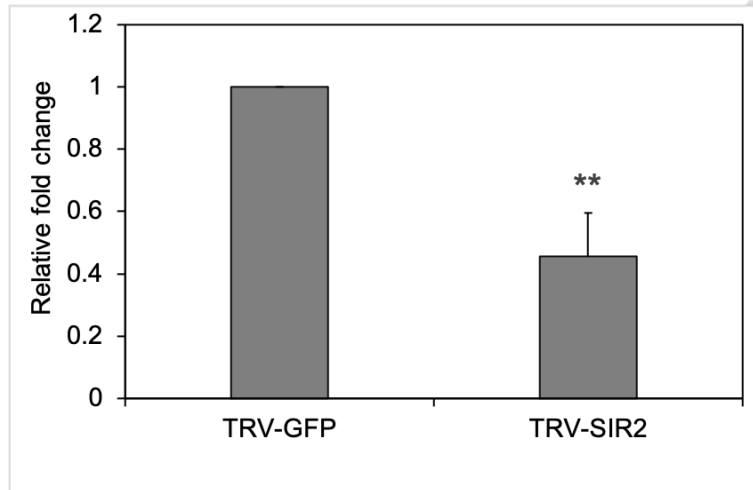
A**B****C**

圖四、過表現 *NbSIR2* 加劇 ParA1 蛋白造成之細胞壞疽

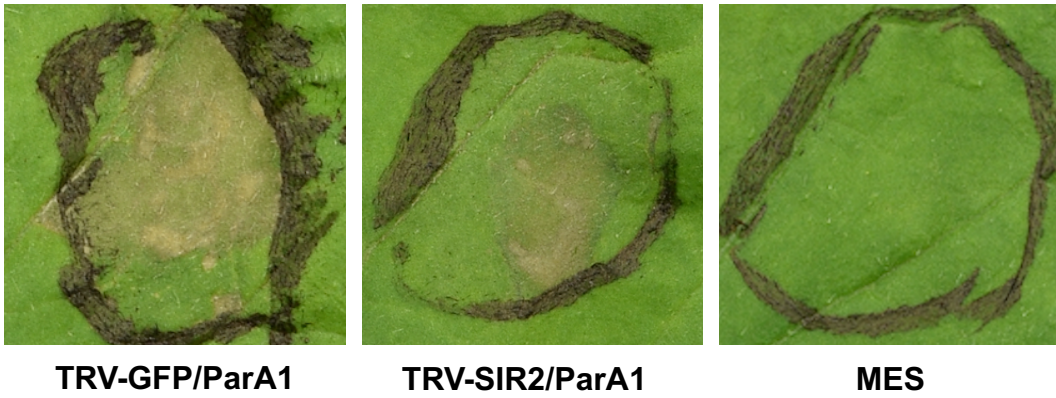
Figure 4. Overexpression of *NbSIR2* enhanced ParA1-induced necrosis on *Nicotiana benthamiana*.

A. *NbSIR2-GFP* was overexpressed. At 24 hours post agroinfiltration to overexpress GFP on one half of a *N. benthamiana* leaf and *NbSIR2-GFP* on the other half, the transcript level of *NbSIR2-GFP* was determined by qRT-PCR. Raw data was normalized by using the *NbEF-1 α* transcript as an internal control and expressed as a fold change relative to the expression of GFP on the other half overexpressing GFP. **B.** Necrosis symptom caused by ParA1 on the leaves of *N. benthamiana*. At 24 hours post agroinfiltration to overexpress GFP on one half of a *N. benthamiana* leaf and *NbSIR2-GFP* on the other half, the leaf was treated with 300 nM ParA1 recombinant protein or 10 mM MES (as a control). The photograph was taken 2 days post infiltration. **C.** Necrosis level as determined by the percentage of necrosis area over the infiltrated area. Asterisks indicate significant differences based on the Student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Values are means (\pm SD) of 4 biological repeats.

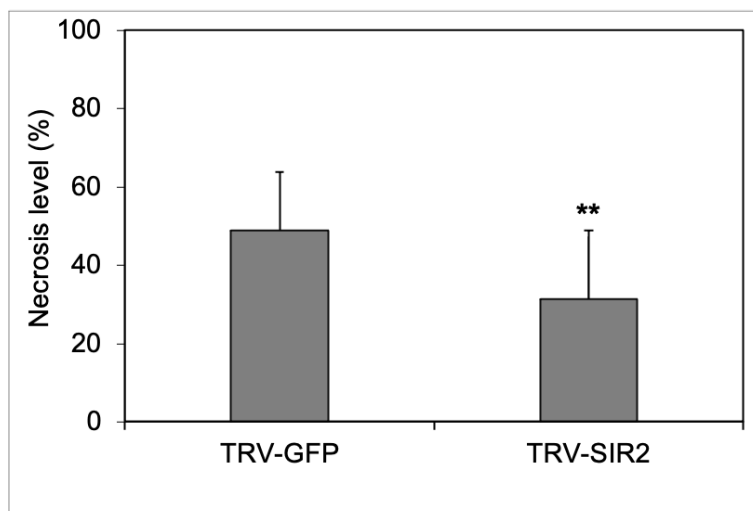
A



B



C



圖五、基因靜默 *NbSIR2* 緩解 ParA1 蛋白造成之細胞壞疽

Figure 5. Downregulation of *NbSIR2* compromised ParA1-induced necrosis on *Nicotiana benthamiana*.

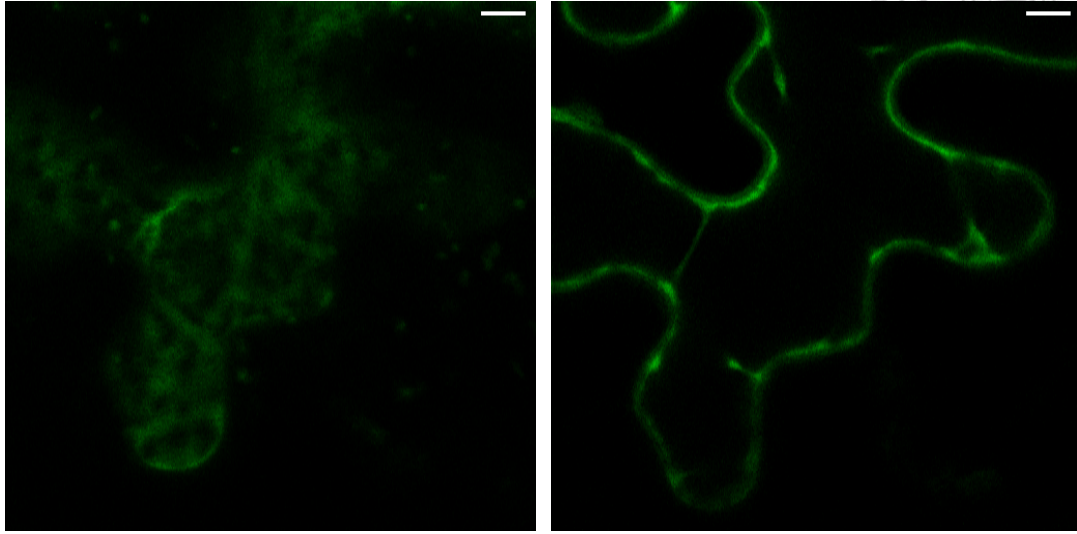
A. Downregulation of *NbSIR2* by TRV-mediated gene silencing. The transcript level of *NbSIR2* was determined by qRT-PCR. Raw data for *NbSIR2* was normalized by using the transcript level of *NbEF-1 α* as an internal control and expressed as a fold change relative to the expression on the control plants with TRV-GFP. **B.** Necrosis symptom induced by ParA1 on *NbSIR2*-silenced plants. ParA1 recombinant protein (300 nM) or 10 mM MES as control was infiltrated into leaves of *N. benthamiana* plants silenced for *NbSIR2* and control plants, respectively. The photographs were taken at 48 hours post infiltration. **C.** Necrosis level as determined by the percentage of necrosis area over the infiltrated area. Asterisks indicate significant differences based on the Student's *t*-test (** $p < 0.01$). Values are means (\pm SD) of 4 biological repeats.

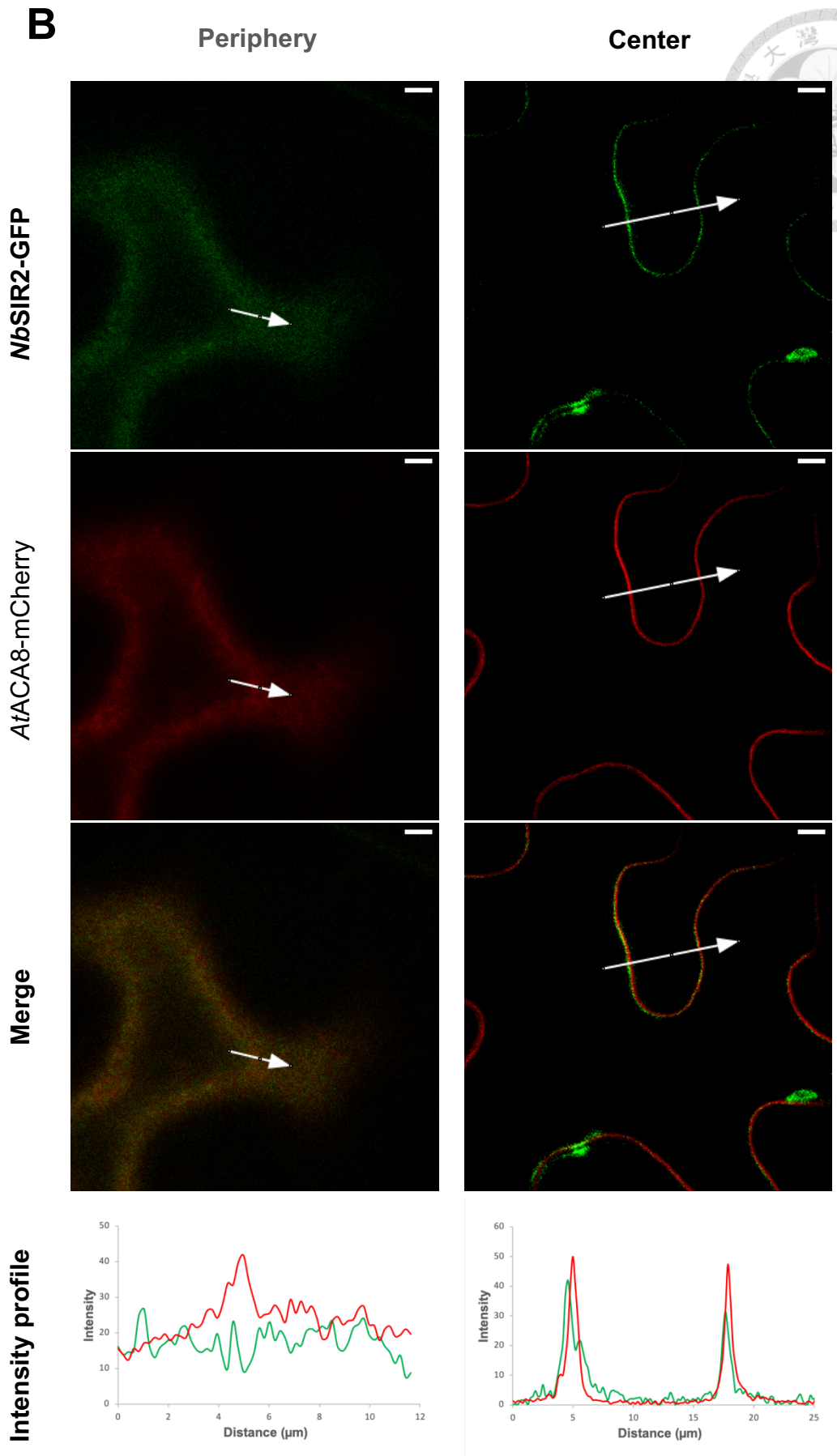
A

Periphery

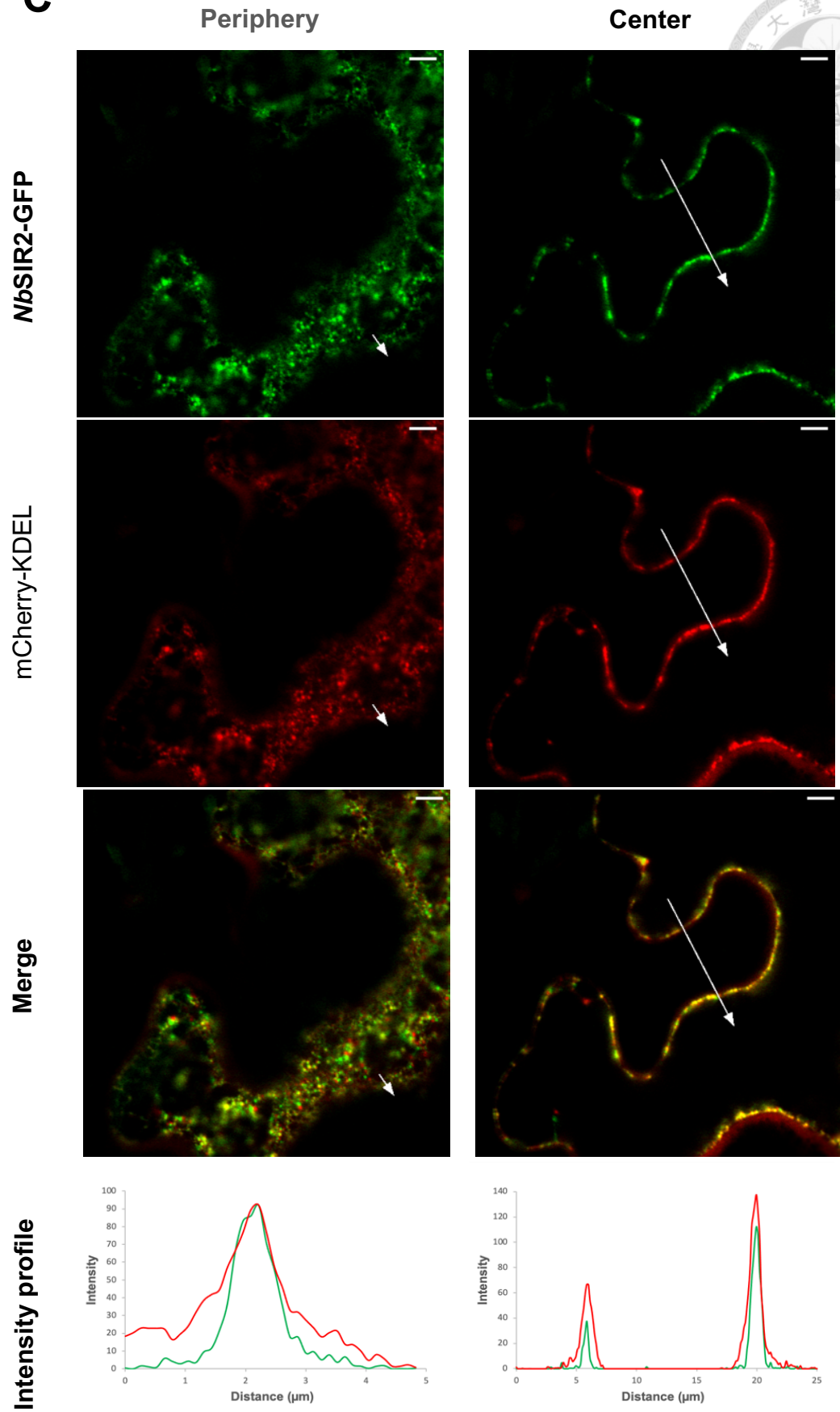
Center

NbSIR2-GFP





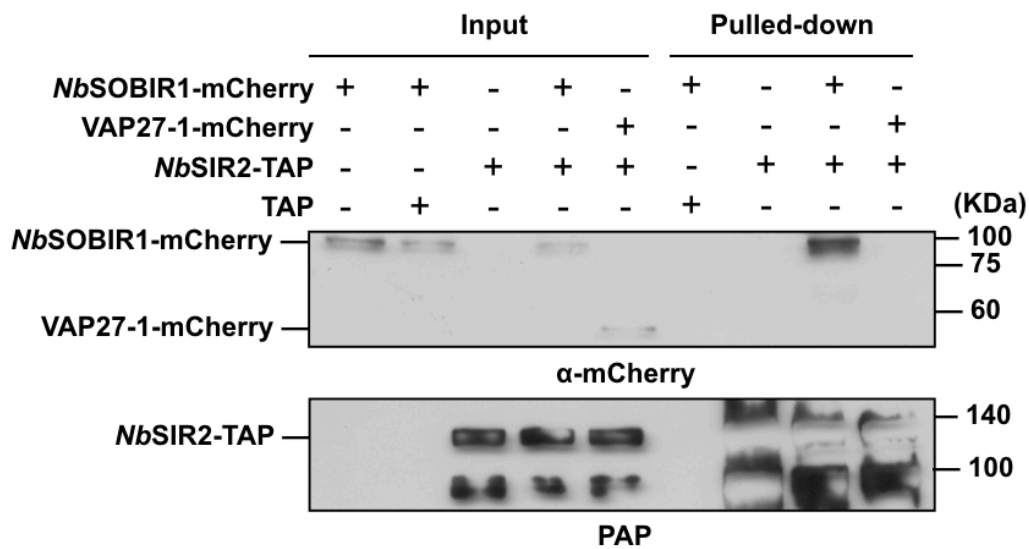
C



圖六、*NbSIR2-GFP* 位於內質網膜

Figure 6. *NbSIR2-GFP* resides in the membrane of endoplasmic reticulum (ER).
A. Still images of *NbSIR2-GFP*. At 44 hours after transient expression of *NbSIR2-GFP* on 4-week-old *Nicotiana benthamiana* leaves, fluorescence signals were captured from the periphery or the center layer of epidermal cells by confocal microscopy. **B and C.** Same as A, except that *NbSIR2-GFP* is coexpressed with the plasma membrane marker *AtACA8-mCherry* (B) or the ER protein marker mCherry-KDEL (C). The white arrows mark the regions for intensity profile analysis in the peripheral and center layer. Lines in green and red represent the intensity from the green and red channels, respectively.

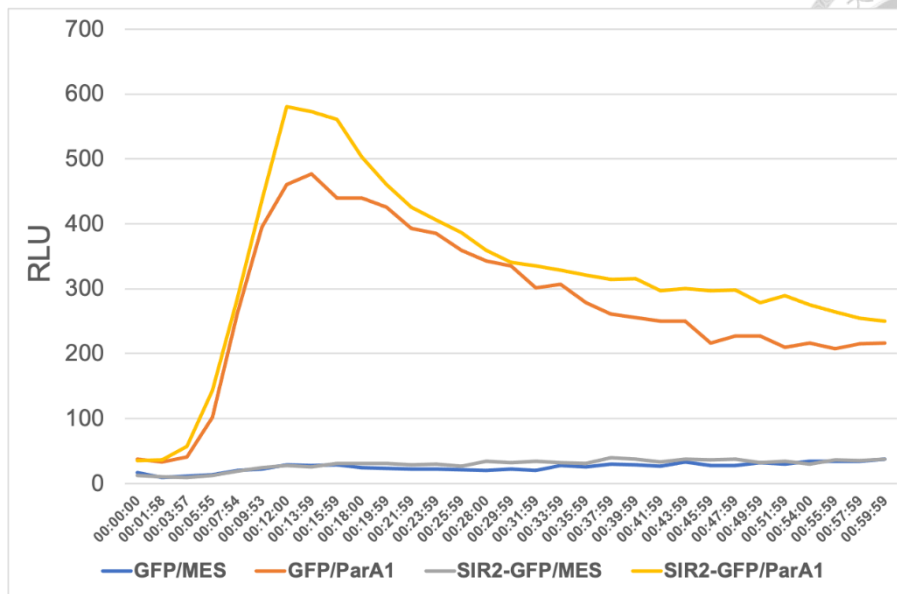
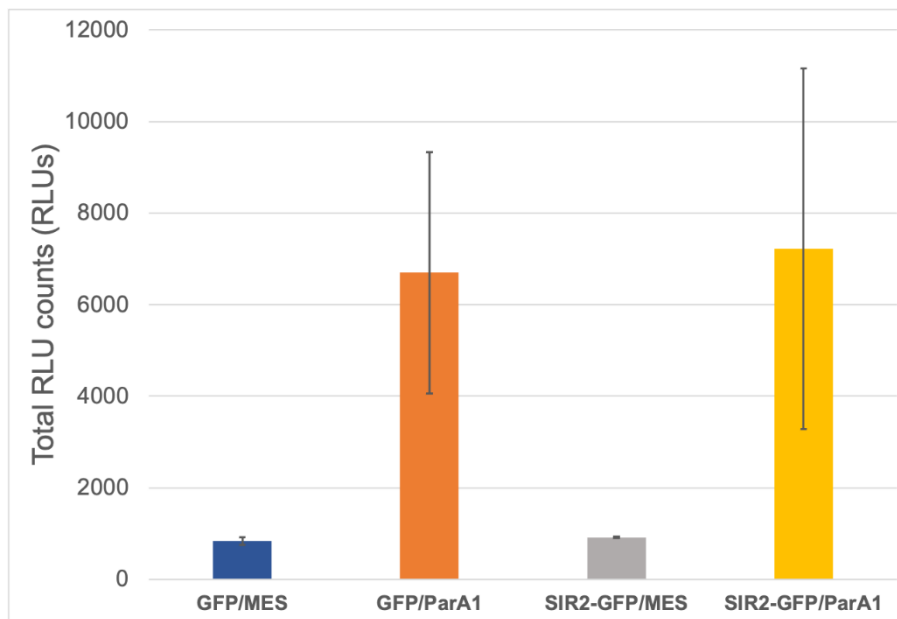
Scale bar, 5 μ m.



圖七、*NbSIR2*-TAP 與 *NbSOBIR1*-mCherry 有交互作用

Figure 7. *NbSIR2*-TAP interacts with *NbSOBIR1*-mCherry in *Nicotiana benthamiana*.

NbSOBIR1-mCherry, VAP27-1-mCherry, *NbSIR2*-TAP, and TAP as indicated were transiently expressed on *N. benthamiana* leaves by agroinfiltration. After 44 hours, the leaves were harvested and lysed to get the lysate (input), followed by immunoprecipitation of the input with IgG Sepharose. The input and the pulled-down fractions were then analyzed by the Western blot using anti-mCherry or PAP antibody.

A**B**

圖八、過表現 *NbSIR2*-GFP 對 ParA1 引發的活性氧化物累積沒有明顯影響

Figure 8. Overexpression of *NbSIR2*-GFP showed no effect on ParA1-induced ROS production in *Nicotiana benthamiana*.

Leaf discs excised from *NbSIR2*-GFP- or GFP-overexpressing *N. benthamiana* leaves were treated with ParA1 recombinant protein (1 μ M) or the MES buffer (as a control). ROS signal was detected by the luminol-based chemiluminescence method. Accumulation of ROS is shown over time (A) or as total count (B). RLU: relative light units. Values are means (\pm SD) of two biological repeats.