

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

一個番茄鋅指蛋白基因之鑑認與功能分析

Identification and functional study of a tomato zinc
finger protein gene



指導教授：詹明才 博士

鄭秋萍 博士

Advisor: Dr. Ming-Tsair Chan

Dr. Chiu-Ping Cheng

中華民國九十八年七月

July, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

一個番茄鋅指蛋白基因之
鑑認與功能分析

Identification and functional study of a
tomato zinc finger protein gene

本論文係趙鐸駿君 (R96B42026) 在國立臺灣大學植物科學研究所完成之碩士學位論文，於民國九十八年七月十七日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員： 臺灣大學農藝學系暨研究所

張孟基 博士

張孟基

臺灣大學植物科學研究所

林讚標 博士

林讚標

臺灣大學植物科學研究所

鄭秋萍 博士

鄭秋萍

臺灣大學植物科學研究所

詹明才 博士 (指導教授)

詹明才

致謝

一晃眼，兩年的歲月走過，這段日子有歡樂也有沮喪，無論如何，都給我的生命帶來豐富的回憶及巨大的成長。首先感謝明才老師與秋萍老師的指導，讓我學習到從事科學研究的寶貴觀念，讓我有機會窺探生技學術殿堂的奧妙，每當我在實驗中受到挫敗時，老師總能給我最大的鼓勵，您們對研究的耐心以及積極樂觀的態度，是我一生都必須學習且受用無窮的。感謝林讚標老師和張孟基老師，撥冗參與我的口試，詳細審閱我的論文並給予最真切的指導，對於一本還不夠完整的論文，您的寶貴經驗將使我的研究內容更加成熟及嚴謹。

要謝謝玉梅學姐，真的就像一個大姐姐，每當實驗絆住我吃飯的時間，您總是義不容辭的當起大廚，照顧我的胃。感謝安琪學長，常坐在我旁邊聽我抱怨實驗上的不愉快，您的指正，確實給予了我對實驗操作上的幫助。感謝淑蓮，教會了我許多種植物的方法，是我最初的導師，您的好脾氣讓人敬愛，我應該好好學習。感謝怡君，送給我綠色盆栽，豐富窗邊風景並給我好心情，您是一個有愛心的人，能讓周圍其他生命生活得更加美好。謝謝巧燕，買便當的好夥伴，有您的日子不無聊，還要感謝您分享的水果，補充我嚴重缺乏的維他命。謝謝小朱，非常有義氣，在口試早上來跟我打嘴砲…喔不!…應該是鼓勵我，有您在真的很安心。謝謝培城，我的運動夥伴，可以一起打球真的很快樂，您的冷笑話是實驗室活力的來源，沒您就不行。謝謝永義師傅，您教了我許多分生實驗的技術，是個偉大的人，有許多實驗的技巧都因您而存在。另外要謝謝實驗室同屆的同學，感謝千惠康樂股長，常常出租您的實驗桌給予不夠空間的同學，您的健談讓周遭的氣氛活絡，充滿笑聲與歡樂。謝謝文潔，雖然您很機車，但我知道那是因為天真導致的自然表現，代表我們的對談是很真誠的，感謝您的指教。謝謝冠中同學，充滿正義的人，很認真的幫大家備份資料，在籃球場上總是帶給別人歡樂。還要感謝學弟妹，宗霖的勤奮，很能分擔別人的擔子，幫助我完成許多實驗。感謝阿宅季穎，半夜留守實驗室，不致於讓我一人面對沉悶的空氣。感謝芸璐，會分享餅乾的新鄰居，在我餓肚子的時候救濟我。謝謝雅婷，認真學習的學妹，您的幽默很特別，能夠持續為實驗室帶來歡樂。

另外要感謝我的家人，爸爸和媽媽給我機會念研究所，您的支持讓我無顧慮的在台北全心衝刺，感謝我的姐姐與妹妹，有你們我才能找到歡笑。感謝姑姑、叔叔還有嬸嬸，回花蓮時給我正面的鼓勵。感謝我在天上的阿公與阿嬤，你們保佑我的生活平安又順利，我對您們的思念都化作前進的動力。最後要謝謝淑敏，陪我走過兩年風雨，妳總是幫我分憂解勞，願妳的笑容與陽光同樣一直溫暖他人，有妳的日子真好。

感謝全部曾經給我幫助的人，這本論文包含您們給予的關懷，未來的日子極其遼闊，不定會有相遇的時候，期盼再碰首的一刻，彼此能滿懷愉悅的訴說回憶的點點滴滴，願人間最美好的事都與我們同在，直到永遠。

2009 7/26 鐸駿

中文摘要

植物生長會遭受非生物性與生物性逆境的影響，其中缺水逆境(water deficit, WD)與青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)造成的細菌性萎凋(bacterial wilt, BW)是限制作物正常的重要因子。BW 與 WD 皆會造成植物缺乏水分，而關於植物對抗這些逆境之相關機制研究尚需探討。本論文針對 WD/BW microarray 分析所選出之基因群，進一步用 virus-induced gene silencing (VIGS)確認其中基因是否參與番茄抗青枯病機制。利用半定量 PCR 檢測已證實在番茄抗病品系中，目標基因經過 VIGS 後，其 RNA 含量確實下降；再進一步將經過基因靜默之番茄植株接種青枯病菌後，植株內之病菌量顯著比對照組植物高，且可造成青枯病萎凋病徵。利用半定量 PCR 測試也證實其中一些基因的 RNA 表現量確實會受青枯病菌感染而上升。為了瞭解各基因之確切功能，本研究進一步針對 *SIZFP* 進行功能性研究。結果發現 *SIZFP* 的 RNA 表現量會受水楊酸及乙烯所抑制，而 *SIZFP* 之綠色螢光重組蛋白在阿拉伯芥原生質體中的表現位置是位於細胞骨架(cytoskeleton)。此外，多個過量表現 *SIZFP* 或 *SIZFP-GFP* 的阿拉伯芥或菸草轉基因品系也已建立。環境逆境測試結果顯示：轉殖 *SIZFP* 可以提升阿拉伯芥對鹽害逆境之抗性，對軟腐病之反應未顯著改變，但卻提早青枯病之發病的時間。從這些結果推測，位於細胞骨架上的蛋白 *SIZFP* 的表現量可能必須維持在平衡的狀態方能維持植物最佳之抗病反應，而 *SIZFP* 在植物病害-逆境反應之相抵觸交互作用中可能具某種的功能。透過本研究所得結果，使得我們對植物對抗缺水逆境與病害機制有更多的了解，且預期可能對研擬青枯病之有效防治管理策略將有所啟發。

Abstract

Plant constantly encounters environmental stresses, including abiotic and biotic factors. Water deficit (WD) and bacterial wilt (BW, caused by *Ralstonia solanacearum* or *Rs*) are very important factors limiting crop production worldwide. The nature of BW shares commonness with that of WD. However, information on plant defense response to these stresses is far from sufficient. To elucidate plant stress defense mechanisms, this study aimed to study functions of a group of genes previously selected from tomato WD/BW microarray analyses. First, the genes were subjected to VIGS assays to study their roles in tomato BW defense response. The transcript accumulation of the test genes in stembases of a silenced BW-resistant tomato cultivar (Hawaii 7996, H7996) was reduced at various levels. Further BW bioassays revealed that silencing of a few genes led to a significant increase of *R. solanacearum* growth and BW symptom development. Additionally, The expression of a few of these genes in a H7996 was enhanced in response to *R. solanacearum* infection, further suggesting their involvement in tomato BW response. Moreover, functional study was performed on *SIZFP*. Its expression at transcriptional level was reduced by salicylic acid and ethephon treatment. Localization assay showed that SIZFP:GFP recombinant proteins colocalized on cytoskeleton with the microtubule marker protein in *Arabidopsis* protoplasts. Transgenic *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* plants containing *35S::SIZFP* or *35S::SIZFP-GFP* have been

generated. Compared to the control plants, the transgenic *Arabidopsis* lines conferred enhanced tolerance to salinity, similar response to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, and increased BW development. These results suggest that the level of SIZFP might need to be fine-tuned in order to achieve the optimal disease defense response. This protein might play some role in the possible antagonistic interaction in plant responses to abiotic and biotic stresses. This study is expected to pave the way not only for elucidating mechanisms and determinants involved in plant stress defense responses, but also potentially benefit the establishment of useful disease control means.



常用名詞之縮寫與全名對照表

縮寫	全名
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
BW	Bacterial wilt
CFP	Cyan fluorescence protein
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
ET	Ethylene
EtBr	Ethidium bromide
GFP	Green fluorescence protein
JA	Jasmonic acid
LB medium	Luria-Bertani medium
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
MS medium	Mijrashige and Skoog medium
PEG 4000	Polyethylene glycol 4000
Pss	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
rpm	Rotation per minutes
Rs	<i>Ralstonia solanacearum</i>
SA	Salicylic acid
Tris	Tris (hydroxymethyl aminomethane)
TTC	2, 3, 5-triphenyl- tetrazolium chloride
VIGS	Virus-induced gene silencing
WD	Water deficit
YFP	Cyan fluorescence protein

目錄

口試委員會審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	iv
常用名詞之縮寫與全名對照表	vi
目錄	vii
表目錄	x
圖目錄	xi
附錄目錄	xii
第一章 前言	1
1. 番茄簡介	1
2. 植物與環境逆境	1
3. 番茄青枯病之相關研究	2
4. 植物缺水逆境之研究	4
5. 病毒誘導性基因靜默	6
6. 鋅指蛋白	7
7. 植物細胞骨架	9
8. 研究目標	10
第二章 材料與方法	11
1. 植物材料	11
2. 常用實驗方法	11
2.1 聚合酶連鎖反應	11
2.2 DNA 凝膠電泳法	11
2.3 小量質體製備	11
2.4 TOPO [®] cloning (Invitrogen)	12
2.5 LR recombination (Invitrogen)	12
2.6 大腸桿菌熱震盪轉型作用	12
2.7 農桿菌電穿孔法	13

3. 植物 RNA 萃取	13
3.1 RNeasy Mini Kit (Invitrogen)	13
3.2 Trizol method	13
3.3 DNase treatment	14
4. 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)	14
5. 病毒誘導性基因靜默	14
6. 番茄接種青枯病菌之評估	15
7. 半定量 RT-PCR	16
8. Real-time PCR	16
9. 番茄接種青枯病菌之樣本收取	16
10. SIZFP 於植物細胞中表現位置之分析	16
10.1 阿拉伯芥原生質體之分離	16
10.2 PEG transfection	17
11. 阿拉伯芥花序浸潤轉殖法	17
12. 快速抽取植物 DNA	18
13. 葉綠素含量測量	18
14. 番茄處理植物荷爾蒙	18
15. 植物逆境檢測	19
15.1 鹽害逆境	19
15.2 種子萌發率測試	19
15.3 乾旱逆境	19
15.3 青枯病菌接種	19
15.3 軟腐病菌接種	20
16. 生物資訊分析與統計分析	20
第三章 結果	21
1. VIGS 基因靜默之效率檢測	21
2. VIGS 靜默特定基因後使番茄對抗青枯病菌能力下降	21
3. 番茄接種青枯病菌後之基因表現分析	22
4. <i>SIZFP</i> -cDNA 之全長調取	22



5. 水楊酸、乙烯及茉莉酸處理番茄後之 SIZFP 表現分析	23
6. SIZFP 可能位在植物細胞骨架上	24
7. 阿拉伯芥轉殖株之篩選與分子檢驗	24
8. 過量表現 SIZFP 增加阿拉伯芥青枯病菌的發病速率	25
9. 過量表現 SIZFP 未顯著影響阿拉伯芥對軟腐病菌的抗性	25
10. 過量表現 SIZFP 稍微增加阿拉伯芥之鹽害耐受性	25
12. 乾旱逆境測試顯示 SIZFP 未顯著影響植物的耐旱性	26
第四章 討論	27
1. 靜默番茄中特定基因後造成番茄外表型改變或降低對抗青枯病菌的能力	27
2. 青枯病菌誘導番茄特定基因之表現量上升	28
3. SIZFP 表現量受到青枯病菌及水楊酸調控	29
4. SIZFP 可能位於植物細胞的細胞骨架	30
5. 35S::SIZFP 轉殖株生長正常	31
6. 過量表現 SIZFP 可能造成阿拉伯芥轉殖株對青枯病菌的抵抗能力下降	32
7. SIZFP 在鹽害中可能扮演的角色	34
8. 總結	34
參考文獻	35

表目錄

表一、VIGS 靜默番茄特定基因並檢測接種青枯菌後之菌量 44

表二、檢測 VIGS 靜默效率所使用之引子 45

表三、用來設計 VIGS 片段所使用之引子 46

表四、Real-time PCR 及 *SIZFP* 選殖所使用之引子 47



圖目錄

圖一、以半定量 RT-PCR 檢測 VIGS 靜默特定基因效率之測定	48
圖二、利用 VIGS 靜默番茄特定之基因使番茄出現生長受阻	49
圖三、半定量 RT-PCR 檢測番茄接種青枯病菌之標示基因	50
圖四、Real-time PCR 檢測番茄接種青枯病菌後一群基因的表現分析	52
圖五、SIZFP 與阿拉伯芥中相似的蛋白質胺基酸序列比對	53
圖六、Real-time PCR 檢測番茄處理水楊酸後 <i>Pti4</i> 以及 <i>SIZFP</i> 的表現情況	54
圖七、Real-time PCR 檢測番茄處理 ethephon 後 <i>Pti4</i> 以及 <i>SIZFP</i> 的表現情況	55
圖八、Real-time PCR 檢測番茄處理茉莉酸後 <i>WIPI-2</i> 以及 <i>SIZFP</i> 的表現情況	56
圖九、SIZFP 之綠色螢光重組蛋白在阿拉伯芥原生質體中的表現位置分析	58
圖十、利用 RT-PCR 檢測 <i>35S::SIZFP</i> 轉殖阿拉伯芥之 <i>SIZFP</i> 表現量	59
圖十一、 <i>35S::SIZFP</i> 阿拉伯芥的外表型與野生株及轉殖空載體之阿拉伯芥比較無太大差異	60
圖十二、三週大阿拉伯芥接種青枯病菌 RD15 進行抗病性測試	61
圖十三、三週大阿拉伯芥接種軟腐病菌	62
圖十四、過量表現 <i>SIZFP</i> 之阿拉伯芥擁有較高的鹽害耐受性	63
圖十五、鹽害逆境下的阿拉伯芥種子萌發率	64
圖十六、乾旱逆境測試顯示 <i>SIZFP</i> 不影響轉殖阿拉伯芥的耐旱性	65

附錄目錄

附錄一、利用 VIGS 篩選 DNA 微陣列選出的可能防禦基因	66
附錄二、反轉錄 PCR 檢測 <i>SIZFP</i> 在 <i>AtNPR1</i> 轉殖番茄中的表現情況.....	67
附錄三、 <i>35S::SIZFP</i> 轉殖菸草已培育到 R1 世代.....	68
附錄四、 <i>35S::ZFP-GFP</i> 轉殖菸草已經培育到 R1 世代.....	69
附錄五、常用培養基及藥劑	70
附錄六、用於 TA clone 的 pCR8 [®] /GW/TOPO [®] 載體.....	73
附錄七、阿拉伯芥及菸草轉殖所用載體.....	74
附錄八、表現 <i>SIZFP</i> 綠色螢光組蛋白所使用的載體.....	75
附錄九、TRV-based VIGS vectors.....	76



第一章 前言

1. 番茄簡介

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 分類上為茄科 (*Solanaceae*)，在世界上屬於高度經濟價值的農作物。番茄帶有 12 對染色體，基因體大小為 9.5×10^8 bp，比起其他茄科植物基因體顯得較小。番茄為雙子葉，互生羽狀複葉，自花授粉植物，花色為黃色，果實大小形狀及顏色依不同品系而有差別。種植上，番茄是喜光植物，最適生長溫度 20-27°C，最適土壤酸鹼值為 5.6-6.7。由於番茄具有豐富維他命、纖維素、果膠及礦物質，是一種高營養的作物，在鮮食及食品加工業需求都極高，近年來更發現番茄具有防癌功能，其富含的茄紅素被評估具有許多醫療效用，且番茄可作為生物反應器(bioreactor)，用於生產口服疫苗或藥用蛋白，因此關於幫助番茄作物產量的研究顯得重要。

2. 植物與環境逆境

植物生長於自然環境中，會受許多逆境影響，進而限制植物的生長與發育，這些逆境大致分為非生物性與生物性因子。非生物性因子包括缺水、鹽害、寒害、重金屬污染等。研究指出，一些重要的作物會因為非生物性因子而損失 50% 以上 (Boyer, 1982; Bray *et al.*, 2000)。生物性因子則包括病原菌、昆蟲、食草動物等，在較嚴重的例子中可以看到作物 100% 完全損失 (Lipka and Panstruga, 2005)。

植物為了適應生物性與非生物性逆境，發展出各式各樣的防禦機制。研究發現植物荷爾蒙(phytohormone)可在植物逆境反應中扮演重要角色，這些小分子包括水楊酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、乙烯(ethylene, ET)以及離層酸(abscisic acid, ABA)等。植物荷爾蒙藉由協同與結抗的方式共同調控植物對抗生物性與非生物性逆境的防禦反應，也就是這兩大類逆境反應的訊息傳導會有複雜的交互作用(signaling crosstalk)(Bostock, 2005; Lorenzo and Solano, 2005; Mauch-Mani and Mauch, 2005)。研究還發現Reactive oxygen species (ROS)在植物在面對生物性與非生物性逆境反應中皆會產生，被認為是訊息傳導交互作用的重

要角色(Apel and Hirt, 2004; Torres and Dangl, 2005)。近代研究利用DNA microarray大量分析基因的表現後，指出植物對生物性與非生物性逆境的反應具有密切的交互作用，例如阿拉伯芥遭遇重金屬(CuSO₄)逆境或病原菌感染後，基因之表現有明顯的重疊性，且ROS在訊息傳導中扮演誘導下游基因表現的重要因子(Narusaka, *et al.*, 2004)，以上文獻指出植物遭遇逆境時會利用複雜的訊息網絡交互調節，用以作出適當的反應。

隨著更多研究的進行，植物對抗逆境的分子機制顯得越趨複雜(Cheong *et al.*, 2002)。除了現有已知的植物防禦基因外，尚有許多未知基因參與在植物逆境生理的調控路徑當中，釐清植物對抗環境逆境的防禦機制，有助培育更具逆境耐受性的植物，幫助農產量上升。

3. 番茄青枯病之相關研究

番茄青枯病(又稱細菌性萎凋病)由青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)所引起，此菌可長期殘存土壤中，是一種全球性的嚴重土壤傳播疾病，危害的作物範圍高達五十幾屬，超過兩百種作物，在熱帶及亞熱帶尤其流行。青枯病菌的感染方式是從植物根部進入，在植物細胞間繁殖並藉由木質部上升到莖部(Vasse *et al.*, 2000; Denny, 2006)，接著青枯病菌會分泌大量的胞外多醣體(extracellular polysaccharide)堵塞植物維管束，使植物因為缺水而萎凋死亡。

現今最有效的防治青枯病菌的方式是種植抗病品種的番茄，但因為感染番茄的青枯病第一生理小種 (race 1)在毒力及基因型上的差異非常高且複雜(Jaunet and Wang, 1999)，使得抗病品種在不同地區針對不同菌株的抗病穩定性產生差異(Chellemi *et al.*, 1994; Lopes *et al.*, 1994; Hanson *et al.*, 1998)。Hawaii 7996 (H7996)是目前發現可以在不同地區對抗不同青枯病菌品種的抗病品系番茄，但值得注意的是H7996並無法達到完全免疫，仍然有被感染的可能性(Prior *et al.*, 1994)。番茄的萎凋病徵被認為與植物體內的青枯病菌濃度有關，當菌量高達 10^9 - 10^{10} CFU g⁻¹時會使番茄出現萎凋病徵(Grimault *et al.*, 1994; Wang and Lin 2005)，在抗病品

系番茄H7996中，青枯病菌的數量會被高度的限制，一般認為是因為H7996產生的polyphenol會抑制青枯病菌在根部的擴散(Vasse *et al.*, 2005)。

雖然青枯病菌造成作物嚴重的損失，但對於作物在分子層面抗病機制的研究仍舊不夠完善。在阿拉伯芥中，已經證實茉莉酸、乙烯以及離層酸的相關防禦機制會參與阿拉伯芥對抗青枯病菌的反應(Deslandes *et al.*, 2002; Hernandez-Blanco *et al.*, 2007; Hirsch *et al.*, 2002)，另外在阿拉伯芥上已成功分離出一個具菌株專一性的抗病基因稱為RRS1，其蛋白產物負責辨認特定的青枯病菌株(Strain GMI1000)之PopP2蛋白以誘發後續之抗病機制(Deslandes *et al.*, 2002, 2003; Lahaye, 2004)，近期更找到與PopP2有交互作用的蛋白RD19，RD19可能是RRS1啟動的防禦機制中一個重要的調控蛋白(Bernoux *et al.*, 2008)。阿拉伯芥的WRKY27也被發現可能扮演負調控的角色，會影響一氧化氮(nitric oxide)的代謝，並藉由調控韌皮部與木質部之間的訊息傳導而影響萎凋病徵的產生(Mukhtar *et al.*, 2008)。在菸草中則是證實，一群calmodulin isoforms表現量下降時，菸草對抗青枯病菌的能力也跟著下降，顯示這些calmodulin參與抗病反應(Takabatake *et al.*, 2007)，而乙烯及離層酸會透過調控ERF家族中的TSRF1表現平衡，增加菸草對青枯病的抗性(Zhou *et al.*, 2008)，另外透過VIGS靜默菸草的熱休克蛋白(small heat shock protein)則是降低了菸草對抗青枯病的能力，顯示熱休克蛋白在抗病機制中的正調控角色(Maimbo *et al.*, 2007)。

以往關於植物對與青枯病菌交互作用的知識，大多來自阿拉伯芥的研究。而番茄對抗青枯病菌的分子機制研究仍不多，僅知道番茄對青枯病之抗病機制極為複雜，例如基因定位(mapping)研究發現，使用不同接種方法或菌株在同一抗病品種可定位到不同或相同的QTL (Wang *et al.*, 2000)；近期文獻使用VIGS系統研究番茄對抗青枯病菌的分子機制，發現可能同時包含水楊酸、乙烯誘導的防禦反應以及MAPK相關基因的參與(Chen *et al.*, 2009)；另外在生物防治上，已知寡雄腐霉 (*Pythium oligandrum*) 可幫助番茄減少由青枯病菌造成的萎凋病徵，且寡雄腐霉會誘導茉莉酸防禦反應幫助對抗青枯病(Hase *et al.*, 2008)；乙烯調控的

*TSRF1*過量表現時，可以提高番茄對抗青枯病菌的能力(Zhang *et al.*, 2004)，而過量表現Arabidopsis non-expressor of pathogenesis-related genes 1 (*AtNPR1*)轉殖番茄能夠提高青枯病耐受性，顯示水楊酸防禦途徑可能會幫助番茄更抗青枯病(Lin *et al.*, 2004)。以上文獻可證明番茄與青枯病菌間存在複雜的交互作用，且由於茄科作物面對青枯病菌時產生的分子機制反應與阿拉伯芥不會完全的等同(Robatzek *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008)，因此有必要對抗病品系番茄對抗青枯病菌的能力作更深入的研究探討。

由於青枯病菌與植物間複雜的交互作用，尚有許多可能的防禦基因需要選殖研究，文獻指出過量表現阿拉伯芥 *NPR1* 或 thionin (*Thi2.1*)的轉殖番茄會增加對抗病害的能力(Lin *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005)，顯示建尋找關建基因並培育抗病轉殖植物的可能性。目前由於缺乏有效的化學方式去抑制青枯病，所以利用分子生物學去探討植物本身的抗病機制，再利用基因轉殖的方式建構具有廣效抗病轉殖植物，變成一種對抗青枯病菌的重要策略。

4. 植物缺水逆境之研究

植物的缺水逆境可以包括乾旱造成的缺水或鹽害造成的缺水，會嚴重影響全球農業的產量。水分是生物維持正常生理活動的必需物質，因為天氣變換造成缺水的乾旱逆境對植物而言是不可避免的挑戰。植物細胞缺乏水份造成的影響包括：細胞膜構造受到破壞而增加透水性，胞器因缺水無法正常運作，胞內酵素之活性降低或者蛋白質變性，細胞脫水另外也會造成胞內電解質濃度升高進而破壞正常代謝功能(Mahajan and Tuteja, 2005)。

植物遭遇缺水逆境，最主要的調適就是避免更多水分流失。研究指出植物遭遇乾旱時，體內離層酸(Abscisic acid, ABA)含量上升，葉部聚集的 ABA 促使保衛細胞之鉀離子流出，使保衛細胞膨壓降低進而關閉氣孔。關閉氣孔會連帶使植物 CO₂ 含量下降，促使過多光能累積，光合作用電子傳遞鏈之電子流向光合系統 I (Photosystem I, PS I) 中的氧分子使其還原，還原作用使植物產生活性氧族

(Reactive oxygen species, ROS), ROS 會造成蛋白質變性, 脂肪過氧化及 DNA 突變。植物為避免乾旱逆境造成的 ROS 氧化傷害, 會增加合成 glutathione reductase (GR) 以及 ascorbate peroxidase (APX) 幫助去除細胞中的 ROS, 研究顯示在缺水反應中 GR 及 APX 表現量會相對上升(Ratnayaka *et al.*, 2003)。此外也發現缺水逆境產生的 ROS 除了造成氧化傷害, 同時可作為一種訊息轉導物質, 例如 H₂O₂ 累積會導致阿拉伯芥氣孔關閉(Desikan *et al.*, 2004)。

其他關於植物對抗缺水逆境之研究包括, 植物面對乾旱體內會產生大量代謝物質如: 糖類(蔗糖 果糖 海藻糖), 胺基酸, 離子, 脫水素(dehydrin), 幫助植物細胞滲透壓調與外界平衡避免過度失水。針對植物耐旱機制, 基因工程方面已有報導指出大量表現合成海藻糖之酵素 Trehalose-6-phosphate synthase (TPS) 可幫助菸草轉植株提升耐旱能力(Zhang *et al.*, 2005); 脫水素基因 *BDN1* 轉殖菸草具有明顯耐旱能力(Wang *et al.*, 2004); 另外亦發現會受乾旱及低溫所誘導的重要轉錄因子 *DREBs*, 轉殖 *DREBs* 至阿拉伯芥會增加植株耐旱性(Agarwal *et al.*, 2006)。

RD29A 是研究缺水逆境中的指標基因, 它的啟動子區域帶有一段重要的序列稱為 dehydration-responsive element (DRE), 後來陸續有許多重要的缺水逆境相關基因被發現, 且這些基因的啟動子上皆包含 DRE, 例如 *RD17*、*ERD10*、*KIN1*、*COR15a* 以及 *COR6.6*(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993; Wang *et al.*, 1995; Thomashow, 1999)。DRE 序列中還包含一段最重要的序列稱作 C repeat (CRT), 負責調控一些缺水逆境基因的表現與否, 利用 yeast one-hybrid 的方式已發現一些特別的蛋白質會結合到 DRE/CRT 這個部位, 這些蛋白質被稱作 DREBs (DRE-binding proteins) 或者 CBFs (CRT-binding factors)(Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998)。文獻中已經證實 *DREB1A* 和 *DREB2A* 分別參與在植物遭遇低溫或缺水逆境時的反應中(Liu *et al.*, 1998), 透過 *CBF1* (*DREB1B*) 過量表現轉殖阿拉伯芥的研究, 也發現 *CBF1* 會調控 cold-regulated genes (*COR*) 表現量上升而增加阿拉伯芥之低溫耐受性(Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998); 同時 *CBF1* 過量表現的番茄轉植株則是增加對缺水逆境的耐受性(Hsieh *et al.*, 2002)。

鹽害逆境亦是造成植物缺水的原因之一，同樣會造成作物產量下降，此逆境通常指土壤中含有過量的離子，尤其是 Na^+ 和 Cl^- 。一般而言，內陸沙漠的高蒸散作用及過度施肥灌溉的農地容易發生高鹽逆境。高鹽逆境對植物的傷害機制，主要是造成土壤低的水勢能，對植物產生一種生理的乾旱(physiological drought)，增加植物獲得水分和養分的困難，因為乾旱和高鹽有共同的滲透逆境的效果。若高濃度的鹽分進入植物體內，過多的 Na^+ 會傷害膜的構造和抑制酵素作用，造成一般代謝失常的問題，進而毒害植物(Mahajan and Tuteja, 2005)。

目前對植物抗鹽害的研究發現， Ca^{2+} 扮演重要角色，植物細胞感受高鹽後，會自胞內 apoplast 釋出 Ca^{2+} 作為訊息傳導因子啟動抗鹽機制(Knight, *et al.*, 1997)。著名的抗鹽機制如 SOS pathway，主要是控制細胞膜上 Na^+/H^+ antiporter 將多餘納離子移出細胞或運入液胞，以維持細胞滲透壓的衡定(Zhu, *et al.*, 2002)；另外也發現植物在鹽害反應中會產生”compatible solutes”，例如果糖及蔗糖，這些溶質不會影響細胞正常代謝功能，反而會降低胞內水勢能以減少水份流失(Delauney and Verma 1993)；除一般醣類外，植物內生的甜菜鹼(betaine)被發現具有調控滲透壓的功能，植物藉由甲基轉換酶(N-methyl transferase)將甘胺酸(glycine)催化成甜菜鹼，過量表現甲基轉換酶的阿拉伯芥體內因此會累積甜菜鹼而提高種子在鹽害中生存的能力(Waditee, *et al.*, 2005)；近期研究還指出，DNA helicases 如 PDH45 的過量表現植株可增加對鹽害的耐受性，推測 PDH45 的功能是幫助蛋白質轉譯穩定的進行(Sanan-Mishra, *et al.*, 2005)。

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

植物為抵抗外來核酸片段（包括病毒及人工基因轉殖的核酸）的侵入，抑制外來核酸片段表現 (Baulcombe, 2004; Fuchs, 2004)，發展出稱為基因靜默現象(亦稱 RNA interference)的防禦機制。若利用病毒攜帶與植物內生基因序列相同的基因片段進入植物體，可造成植物內生基因的表現被抑制、默化，此現象稱之為 virus-induced gene silencing (VIGS)。近年來，VIGS 已被研發成一項簡便且快速

之暫時性(transient)抑制植物基因表現的技術平台，避免植物基因轉殖的耗時及費力，抑制效果亦十分顯著，因此 VIGS 已成為植物基因研究的有效工具(Liu *et al.*, 2002; Constantin *et al.*, 2004; Valentine *et al.*, 2004)，一些不同的植物 RNA 及 DNA 病毒都已經證實可以當作有效的 VIGS 載體。

Tobacco rattle virus (TRV)-based 載體是目前普遍使用的 VIGS 載體，可運用於多種不同植物的研究。以阿拉伯芥為材料，關於 TRV-VIGS 的實驗條件已被建立，近年來更被廣泛應用於植物抗病機制的研究，例如文獻指出，利用 VIGS 靜默阿拉伯芥的 *RAR1*、*HSP90* 或 *NDR1* 會使植物被 *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* 感染的病徵更加嚴重，顯示這些基因在植物抗病反應中扮演正調控角色；相反的靜默 *RIN4* 以後，會增加植物對抗病原菌的能力，顯示 *RIN4* 可能是植物防禦反應中的負調控者(Cai *et al.*, 2006)；TRV-VIGS 實驗亦被用來揭示番茄與維管束病害青枯病菌之間的複雜關係，研究發現一些水楊酸、乙烯以及 MAPK 的相關防禦基因靜默後，會導致番茄對抗青枯病菌的能力下降，證實番茄對抗青枯病菌會涉及多個路徑共同調控防禦反應(Chen *et al.*, 2009)。

除使用 TRV-VIGS 研究植物抗病機制外，也有實驗使用 barley stripe mosaic virus (BSMV)-VIGS 靜默大麥中的 *RAR1*、*HSP90* 以及 *SGT1*，並發現大麥對於露菌病(powdery mildew)的抵抗能力降低(Hein *et al.*, 2005)。另外，VIGS 實驗也被應用在研究植物對抗缺水逆境反應的基因群，靜默菸草中特定基因例如：*SIP*、*HSP70*、*ADH* 或 *F4OGT*，會使菸草對抗缺水逆境的能力減弱(Senthi-Kumar *et al.*, 2007)。由以上文獻可證明，透過 VIGS 系統確實可篩選出重要的植物防禦基因，應用這類基因來增進番茄或其它作物之抗病性，將有效幫助農業經濟之發展。

6. 鋅指蛋白(Zinc finger protein, ZFP)

ZFP是一種普遍存在真核生物中的重要蛋白，帶有 zinc finger domain 的蛋白可能與 DNA、RNA 或其它蛋白質有交互作用的能力，進而調控生物體的訊息傳導路徑並扮演重要的控制角色，例如調控生長發育與細胞凋亡的路徑等

(Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008)。

ZFP的特徵是以前其胺基酸序列中Cys和His與鋅離子形成類似手指狀的結構，ZFP的分類則是以Cys和His的數量及排序為依據。RING (really interesting new gene)蛋白被歸類為ZFP中的一類(Freemont *et al.*, 1991)，RING蛋白包含有Cys/His-rich motif (C3HC/HC3)，根據第五個胺基酸是Cys或著His，又分為RING-HC和RING-H2兩種RING蛋白(Freemont, 2000)。目前在動物、植物及病毒中皆有發現可以轉譯RING蛋白的基因(Freemont, 1993; Jensen *et al.*, 1998; Saurin *et al.*, 1996)。在植物中，已有許多RING蛋白被研究，且被證實參與重要的植物生理調控，例如光形態發生的抑制子COP1 (Deng *et al.*, 1992; Torii *et al.*, 1998)；與種子發育相關的RIE1 (Xu and Li, 2003)；會受熱所誘導的RZFP1(Zeba *et al.*, 2009)；提供缺水逆境耐性的XERICO (Ko *et al.* 2006)。

在生物性逆境中也有許多RING蛋白被發現參與植物抗病反應(Devoto *et al.*, 2003; Goritsching *et al.*, 2007)，EL5被發現會受到激發子(elicitor)的誘導而表現，激發子定義上被認為可以引起植物的防禦反應(Boller, 1995)；XA21與XB3透過彼此的交互作用，可以誘導下游植物防禦反應產生，進而使植物對抗*Xanthomonas oryzae pv oryzae* (Wang *et al.*, 2006)；在阿拉伯芥中還有一群RING蛋白稱作ATL家族，ATL基因會受到真菌的激發子所誘導表現(Serrano *et al.*, 2006)，且ATL中的*OsBIRF1*也被證實會受到水楊酸及茉莉酸的誘導，*OsBIRF1*過量表現的轉殖植物會增加對抗細菌性斑點病的能力(Liu *et al.*, 2008)。上述文獻皆證實RING蛋白在植物防禦反應中的重要性。

以往的研究中發現，RING motif具有蛋白質交互作用的能力，應用此能力RING蛋白可調控要細胞生理代謝，一些RING蛋白可以連結到E2 ubiquitin-conjugating enzymes上，E3 ubiquitin-protein ligase的活性也與RING domain有關聯(Freemont, 2000; Joazeiro and Weissman, 2000; Joazeiro *et al.*, 1999)，另外還有許多植物的RING蛋白被發現與ubiquitin調控的蛋白質分解系統有相關性，例如COP1-interacting protein CIP8 (Torii *et al.*, 1999)； elicitor-responsive

ubiquitin ligase EL5 (Takai *et al.*, 2002)，過去研究指出ubiquitin所參與的蛋白質分解系統是非常重要的細胞生理調控機制，而參與其中的RING蛋白的重要性也因此顯現出來。

7. 植物細胞骨架

細胞骨架(cytoskeleton)是細胞內以蛋白質纖維為主要成分的網絡結構，根據蛋白質纖維的直徑、組成成分和組裝結構的不同可分為微絲(microfilament)、微管(microtubule)和中間絲(intermediate filaments)。細胞骨架支撐並維持細胞的形狀，另外也參與細胞運動、物質運輸、能量轉換、信號傳遞和細胞分裂等生理活動。過去研究指出，植物細胞骨架在非生物性逆境中扮演重要角色，例如：鹽害逆境中，微管藉由調控鈣離子通道控制鈣離子流通，進而幫助植物對鹽害作出反應(Thion *et al.*, 1998; Chinnusamy *et al.*, 2005)；ABA與植物缺水逆境有重要關聯，同樣會調控微管的分布與組成(Shibaoka and Nagai 1994)；Phospholipase D (PLD)受ABA與ROS調控並參與植物非生物性逆境反應，研究指出PLD活化時會造成細胞中微管的重新排列(Dhonukshe *et al.*, 2003)。另外，在生物性逆境方面也發現植物細胞骨架參與植物抗病反應，例如在病菌侵入細胞的位置，微絲的分布多寡會影響植物的抗性(Kobayashi *et al.*, 1994)；當微絲的聚合受到抑制時，植物的過敏性反應(hypersensitive response)呈現延遲的現象(Takemoto *et al.*, 1999)；*Xanthomonas campestris*的effector AvrBs3可能會破壞微管的聚集使葉肉細胞膨脹(Marois and Zambryski, 2002)；另外病毒之movement protein會隨植物骨架移動，調控Plasmodesmata大小，幫助病毒於植物細胞間之擴散(Waigmann *et al.*, 1994)。以上研究顯示，植物細胞骨架確實參與植物遭遇逆境時的反應，細胞骨架幫助訊息傳導的進行，同時也調整細胞的構形去適應逆境的影響，未來更多的研究將有助於釐清細胞骨架在植物逆境反應中所扮演的角色。

8. 研究目標

本論文旨在透過一系列的實驗，篩選抗病品系番茄中可能參與對抗青枯病菌之防禦基因，並藉由過量表現可能的防禦基因到模式植物中，深入研究該基因在植物面對環境逆境時的確切功能。



第二章 材料與方法

1. 植物材料

本實驗所使用的番茄為抗青枯病品系 H7996 與青枯病感病品系 L390，種子以一般自來水浸泡並震盪培養兩天，萌發後移至三英吋花盆，於 12 小時光照 25°C，12 小時黑暗 20°C 培養。十字花科阿拉伯芥哥倫比亞品系 (*Arabidopsis thaliana, Columbia 0*) 為本實驗研究未知防禦基因的模式植物，培養條件為 22°C，16 小時光照、8 小時黑暗。*Nicotiana benthamiana* 為菸草轉殖中使用的品系，培養條件為 26°C，16 小時光照、8 小時黑暗。

2. 常用實驗方法

2.1 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

一般 PCR 之總體積為 20 μ L，內含反應物為 250 μ M dNTP、0.5 μ M forward primer、0.5 μ M reverse primer、1 \times buffer、1U DNA Taq polymerase 及 1~100 ng DNA template。PCR 反應條件為 94°C 5 分鐘，94°C 30 秒，(primer T_m) °C 30 秒，72°C X 秒(視擴增片段長短而定)，經 30 個循環後以 72°C 7 分鐘結束反應。

2.2 DNA 凝膠電泳法

依照欲分離之 DNA 片段大小決定凝膠濃度(例：500 bp 以上片段用 0.8 % TBE gel 分離，500 bp 以下片段用 1 % TBE gel 分離)，秤取適量瓊脂(agarose)後，加入 0.5 \times TBE 緩衝液，以微波加熱溶解瓊脂溶液，待溫度降低後依照每 50 mL 瓊脂溶液加入 0.5 μ L EtBr (50 mg/mL)的比例製作內染膠，搖勻後倒入膠片鑄模。跑膠時根據 DNA 片段大小決定電流伏特，樣品到達適當位置後以 UV transillunator box 檢視分離條帶的位置與亮度。

2.3 小量質體製備(Minipreparation of plasmid DNA)

使用 PRO TECH 公司的 Gene-spin™ miniprep purification kit-V² 進行質體製備。將單一菌落放入含抗生素的培養液(例：pCR8 抗 spectinomycin；pCR2 抗 kanamycin 以及 ampicillin)，在 37°C 震盪培養 16 小時後，取 1.5 mL 菌液 13000 rpm

離心 1 分鐘，倒掉上清液，加入 200 μL solution I 懸浮菌塊，再加入 200 μL solution II，上下緩慢搖晃使溶液均勻，待細胞破裂後加入 200 μL solution III 中和，均勻混合後以 4°C/13000 rpm 離心 20 分鐘，取出上清液至 kit 提供的特殊離心管，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，將 DNA 留在特殊離心管的膜上，將下層溶液倒掉後加入 600 μL washer buffer 清洗特殊離心管，離心後去除下層溶液再以 13000 rpm 離心 3 分鐘抽乾 washer buffer，最後加入 50 μL 二次水回溶 DNA，離心後得到欲分離之質體 DNA，可用於大部分酵素反應及定序。

2.4 TOPO[®] cloning (Invitrogen)

利用 PCR 增幅 VIGS 實驗用的基因片段(引子列於表三)，以及增幅 *SIZFP* 開放轉譯架構(open reading frame, ORF)(引子列於表四)。PCR 增幅後的 DNA 利用 TA cloning 原理構築於 pCR8[®]/GW/TOPO[®] 載體(附錄六)，每次 TA cloning 反應的條件為：PCR 產物 0.3~3 μL 、1 μL salt solution、0.5 μL pCR8[®]/GW/TOPO[®] vector，最後補水至 6 μL ，反應於室溫中進行 30 分鐘，結束後放置於冰上即可進行熱震盪轉型作用。

2.5 LR recombination (Invitrogen)

VIGS 實驗用的基因片段構築於 pCR8[®]/GW/TOPO[®] vector 後，重組到 TRV vector (附錄九)；*SIZFP* 開放轉譯架構(open reading frame)重組到 pEarleyGate 201 (附錄七)、p2FGW7 以及 p2GWF7 (附錄八)，LR recombination 的反應條件為：50-150 μg entry vector、50~150 μg destination vector、1 μL 5×LR Clonase[™] II enzyme mix，最後以 TE buffer (pH 8.0)補至總體積 8 μL 。於室溫中反應三小時後，加入 1 μL proteinase K 溶液並置於 37°C 10 分鐘使反應中止。

2.6 大腸桿菌熱震盪轉型作用(Transformation of *E. Coli* by heat-shock)

將大腸桿菌 DH5 α 勝任細胞與質體 DNA 混合，置於冰上 30 分鐘後以 42°C 水浴熱處理 45 秒，處理後即刻將勝任細胞置於冰上 3 分鐘，接著加入 750 μL 以 37°C 加溫過的 SOC 培養液，再將勝任細胞放入 37°C 生長箱搖晃培養 1 小時，培養後以 6000 rpm 離心 3 分鐘沉澱大腸桿菌，倒掉多餘培養液後留下約 100 μL 培

養液懸浮大腸桿菌，塗抹於含抗生素的 LB 固體培養基培養於 37°C 生長箱。

2.7 農桿菌電穿孔法(Transformation of *A. tumefaciens* by electroporation)

自 -80°C 冰箱取出農桿菌勝任細胞放置冰上，等待約 10 分鐘使其解凍，將農桿菌勝任細胞(GV3101 or LBA4404)放入 0.2 cm cuvette 並加入 2 μ L 質體 DNA，以 MicroPulsar (BIO-RAD) 2.5 kV 進行電擊，之後加入 1 mL YEP 培養液並將農桿菌放置於 28°C 生長箱搖晃培養 2 小時，培養後塗抹於 YEP 固體培養基。

3. 植物 RNA 萃取

3.1 RNeasy Mini Kit(Invitrogen)

收取 0.1 g 植物組織，放入研鉢並加入適量液態氮後，以研杵研磨至粉末，將粉末移至 1.5-mL 微量離心管，加入 450 μ L buffer RLT 及 4.5 μ L β -mercaptoethanol，混合均勻後於 56°C 處理 3 分鐘，處理後的細胞裂解液移至 QIAshredder spin column，以 13000 rpm 離心 2 分鐘，收集通過 column 的澄清液置入乾淨的微量離心管，加入 250 μ L 100%酒精，混合均勻後將樣本放入 RNeasy spin column，以 10000 rpm 離心 1 分鐘後，丟棄通過 column 的澄清物，利用 700 μ L RW1 緩衝液清洗 RNeasy spin column，離心後去除 RW1 緩衝液，加入 500 μ L RPE 緩衝液清洗兩次，離心後去除 RPE 緩衝液，再以 13000 rpm 離心 2 分鐘去除 column 中殘餘的酒精，將清洗後的 RNeasy spin column 置入新的微量離心管，加入 30~50 μ L DEPC 水，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，即可得 RNA 樣本。

3.2 Trizol method

收取 1g 植物組織，利用適量液態氮，以研鉢及研杵研磨至粉末，將粉末放入 50-mL 離心管，加入 15 mL TRIzol 試劑，混合均勻並置於室溫下 30 分鐘，再加入 3 mL chloroform，反轉離心管混勻後，以 4°C 10000 rpm 離心 20 分鐘，將上層上清液置入新的 50-mL 離心管，加入 12mL 異丙醇冰入 -80°C 冰箱。過夜後以 10000 rpm 離心 20 min，去掉上清液後將離心管放入抽風櫥，待殘於異丙醇揮發後加入 400 μ L DEPC 水，RNA 回溶後放入新的 1.5-mL 微量離心管，加入

800 μL phenol: chloroform(1: 1)，混合均勻後以 4°C 13000 rpm 離心 15 分鐘，吸取上層上清液約 200 μL ，分裝至兩管新的 1.5-mL 微量離心管並加入 3M 醋酸鈉 30 μL 以及 1 mL 100%酒精，冰入-80°C 冰箱，一管樣本作長期保存，另一管待過夜後以 4°C 13000 rpm 離心 20 分鐘，去除上清液後沉澱物以 75%酒精清洗兩次，待殘餘酒精揮發後以 200 μL DEPC 水回溶。

3.3 DNase treatment

使用 Promega 套組，取 5 μg RNA 後加入 5 μL DNase、5 μL 10x buffer，補 DEPC 水至總體積 50 μL ，於 37°C 處理 1.5 小時，補 DEPC 水至 200 μL ，加入 200 μL phenol:chloroform (1:1)，混合均勻後，以 4°C 13000 rpm 離心 20 分鐘，將上層上清液取出至乾淨的 1.5 mL 微量離心管，加入總體積 1/10 的 3 M 醋酸鈉 (pH 5.3) 及等體積的 100%酒精，混合均勻後，置於-80°C 過夜後，以 4°C 13000 rpm 離心 30 分鐘，再用 75%酒精清洗 RNA，快速離心去除酒精後，用 30-50 μL DEPC 水回溶 RNA，RNA 濃度是以 NanoDrop 測量 A_{260}/A_{280} 的比值而得。

4. 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

本實驗使用的試劑為 Promega kit。利用 Oligo (dT)₁₅ 當作引子，將帶有 poly A tail 的 mRNA 合成 cDNA。方法如下，取 0.5~1 μg 的總核糖核酸，補水至 10.2 μL ，70°C 加熱 10 分鐘後，加入 2 μL 的 dNTP mix (10 mM)、1 μL 的 Oligo (dT)₁₅ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、2 μL 的 10x reverse transcription buffer、4 μL 的 MgCl_2 (25 mM)、0.4 μL 的 AMV reverse transcriptase (15U/1 μL) 及 0.4 μL recombinant RNasin ribonuclease inhibitor，置於 42°C/1.5 小時，於 95°C 加熱 5 分鐘以中止反應，cDNA 補水至總體積 80 μL 後冰-20°C 備用。

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

將期望靜默之目標基因以 PCR 方式增幅特定片段(PCR 所用之引子列於表三)，將此特定片段裝載於 pTRV2 載體(附錄九)並轉型入農桿菌 GV3101。把各

個攜帶有 pTRV1 或 pTRV2 裝載目標基因片段的農桿菌培養在 3 mL YEP medium (0.5% peptone, 0.5% yeast extract and 1% sodium chloride), YEP 中包含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rifampicin, 隔天將農桿菌放大培養在帶有抗生素與 10 mM MES 以及 20 mM acetosyringone 的 25-mL YEP 中, 放大培養後以 3000 rpm 室溫離心, 去除上清液之後以培養液(10 mM MgCl_2 , 10 mM MES, 200 mM acetosyringone, pH5.6) 懸浮農桿菌並調整農桿菌濃度為 $\text{OD}_{600}=1.5$, 將帶有 pTRV1 與 pTRV2 裝載目標基因片段或 empty pTRV2 vector 的農桿菌以 1:1 的比例混合, 置於 28°C 培養 3 小時後即可利用 1-mL 針筒將農桿菌注射入七天大的番茄子葉, 注射後之番茄放置於 16 小時光照/8 小時黑暗 22°C 生長箱, 10 天後進行青枯病菌接種, 接種 5 天後進行青枯病菌濃度定量, 並以 -80°C 保存兩棵 VIGS 番茄之根、莖基部、莖做為之後半定量 RT-PCR 檢測 VIGS 靜默特定基因效率之用。

6. 番茄接種青枯病菌之評估

番茄品系 H7996 與 L390 分別為實驗的抗病與感病控制組。青枯病菌品系 Pss4 (phyloptype I, biovar 3) 從 -80°C 冰箱劃於 TTC 固體培養基上, 28°C 培養兩天後以 3 mL 523 培養液於 28°C 180 rpm 培養一天, 再將菌液塗於 523 固體培養基於 28°C 培養一天。利用無菌水將青枯病菌自培養基上洗下, 調整懸浮菌液濃度為 OD_{600} 0.6, 將番茄以刀片斷根後, 直接澆灌 25 mL 菌液於培養著番茄的兩英寸土盆中。觀察植物接菌後之外表形變化, 並於接菌後第五天, 截取約一公分長度的番茄莖基部與莖部, 測量重量後分別加入 1 mL 之無菌水以研杵搗碎, 吸取 100 μL 組織粹取液以無菌水作序列稀釋後, 從各個序列稀釋的樣本中吸取 10 μL 樣本點至 SM1 培養基(Lin *et al.*, 2008) 並培養於 28°C 生長箱, 兩天後記錄青枯病菌之菌落生長情況。每個欲分析之基因每批實驗為 12 顆植物, 並重複三批不同的實驗。

7. 半定量 RT-PCR

VIGS 處理後之番茄以半定量 RT-PCR 檢測目標靜默基因的表現量，總反應溶液包含 4.9 μL Reverse Transcription 10 \times buffer、3.75 μL MgCl_2 (25mM)、0.36 μL dNTP mixture (25 mM)、1 μL forward primer (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、1 μL reverse primer (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、0.15 μL Taq polymerase (bio-east, 2U/ μL)及 8 μL cDNA 溶液，其餘補二次水至 50 μL 。依據 primer T_m 及 DNA 片段大小設定 PCR 反應條件，於 PCR 擴增反應第 20、24、27、30、35、40 個重複時各收取 5 μL 樣本，利用帶有 EtBr 的 1% (w/v)瓊脂凝膠分析半定量 RT-PCR 之結果。半定量 RT-PCR 的引子列於表二。

8. Real-time PCR

使用 Bio-Rad Real-Time PCR Detection Systems，反應總體積為 18 μL 。cDNA 稀釋為 15 ng/ μL 後取 8 μL ，另外加入 9 μL SYBR Green Supermix，0.5 μL 的 forward primer (10 μM)，0.5 μL 的 reverse primer (10 μM)，混合均勻後放入 Real-Time PCR Detection 反應器中進行反應，再以 iQ5 軟體分析。本論文 Real-time PCR 使用之引子列於表四。

9. 番茄接種青枯病菌之樣本收取

使用抗病品系番茄 H7996，種子以一般自來水浸泡，室溫下搖晃 3 天後，播種於三英吋花盆，放置於 12 小時光照/12 小時黑暗 26 $^{\circ}\text{C}$ 溫室生長 3 周後，準備懸浮於去離子水中 $\text{OD}_{600}=0.3$ 之青枯病菌菌株 Pss4 懸浮液，對照組為去離子水，每棵植株澆灌 20 mL 菌液或去離子水於土盆，收取澆灌 0、6、12、24 以及 48 小時後之番茄根、莖基部、莖組織，以液態氮瞬間冷卻後保存於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱備用。

10. SIZFP 於植物細胞中表現位置之分析

10.1 阿拉伯芥原生質體之分離

本實驗參考自 Yoo *et al.*, 2007.，取弱光下生長 3-4 周之阿拉伯芥葉片，利用

3M 貼紙將葉片下表皮撕除，將除去下表皮之葉片浸泡在裝有酵素溶液的培養皿，於室溫下 50 rpm 搖動 1.5 個小時後，吸取培養皿中含有原生質體的溶液到乾淨的離心管中，以 900 rpm 離心 2 分鐘，去除酵素溶液後加入 10 mL W5 緩衝液清洗兩次，之後以 10 mL W5 緩衝液再懸浮原生質體，並以血球計數器決定原生質體濃度。將剩餘原生質體放置冰上三十分鐘，待其自然沉降後，再將 W5 緩衝液移除，並利用 MMg 緩衝液懸浮原生質體使其濃度為 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ，懸浮後放置於室溫即可。

10.2 PEG transfection

利用 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) 抽取質體 DNA，將 20 uL 質體 DNA (20~40 ug) 加入塑膠管中，再加入 200 uL 以 MMg 緩衝液懸浮之原生質體到塑膠管，最後加入 220 uL PEG，以手指輕彈塑膠管使溶液混合均勻，放置室溫下 5 分鐘後加入 3 mL W5 緩衝液清洗兩次以去除 PEG，清洗過的原生質體最後以 2 mL W5 緩衝液懸浮，用滴管吸出原生質體後，滴於事先以 1.5 mL 5% BSA 處理 30 分鐘的六孔盤中，原生質體以一般日光燈照射，於室溫中放置 16-24 個小時後以共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imagine System) 觀察拍攝。

11. 阿拉伯芥花序浸潤轉殖法

農桿菌 GV3101 以帶有適當抗生素的 3 mL YEP 培養液培養在 28°C 生長箱，隔夜後以 200 mL YEP 培養液放大培養一天，再以 3000 rpm 25°C 離心 20 分鐘，去除上清液後用 inoculation medium 懸浮農桿菌使其濃度為 OD₆₀₀ 0.8。將剪去果莢的阿拉伯芥花序浸泡於農桿菌懸浮液中 30 秒，浸泡後的阿拉伯芥放置於黑暗中過夜，再放回植物培養室培養 (22°C, 16 小時光照/8 小時黑暗)。約一個半月果莢乾燥後即可收取種子 (Clough and Bent, 1998)。轉植株之篩選是將種子撥種於荷蘭土上，一星期後噴灑 25 mg/L 殺草劑使子葉完全濕潤，轉植株之載體 (pEarleyGate 201) 帶有抗殺草劑基因可以正常生長，約四天後將不受殺草劑抑制

之阿拉伯藉推測為轉殖株，再以 Genomic PCR 以及 RT-PCR 驗證。

12. 快速抽取植物 DNA

本實驗參照 Kasajima *et al.*, 2004，配製 DNA 萃取緩衝溶液如下：200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS。以 TE buffer 10 倍稀釋 DNA 萃取緩衝溶液後放入微量離心管並加入 3-5 mg 植物葉片組織，利用小型研磨棒將葉片組織磨碎後，避開破碎的組織吸取 1 μ L 萃取後的液體，即可用於一般 PCR。

13. 葉綠素含量測量

收取植株地上部，以微量天平稱取重量，將植物組織放在研鉢中並倒入液態氮磨成粉末，依照 1 g 組織加入 10 mL 80% 丙酮的比例加入丙酮，混合均勻並在室溫下作用十分鐘，接著以 4°C 10000 rpm 離心五分鐘，取上清液測其 663 nm 與 645 nm 之吸光值，將所得數據以 Arnon 1949 的公式進行計算。

14. 番茄處理植物荷爾蒙

以 100% 酒精配製 1 M 水楊酸，再以無菌的去離子水稀釋成 2 mM 水楊酸。將 2 mM 水楊酸均勻噴灑在兩周大番茄 H7996 品系的葉子，收取處理後 1、2、4、8、24、36 小時的葉部組織，每個時間點各收兩棵，0 小時為不處理水楊酸的番茄作為對照組。

以 100% 酒精配製乙烯前驅物 ethephon 為濃度 100 mM，再以無菌的去離子水稀釋成 1 mM ethephon。將 1 mM ethephon 均勻噴灑在三周大的番茄 H7996 品系的葉子，收取處理後 1、2、4、8、24 小時的葉部組織，每個時間點各收兩棵，0 小時為不處理 ethephon 的番茄作為對照組。

以 100% 酒精配製茉莉酸為濃度 100 mM，再以無菌的去離子水稀釋成 0.1 mM 茉莉酸。將 0.1 mM 茉莉酸均勻噴灑在三周大的番茄 H7996 品系的葉子，收

取處理後 1、2、4、8、24 小時的葉部組織，每個時間點各收兩棵，0 小時為不處理茉莉酸的番茄作為對照組。

15. 植物逆境檢測

15.1 鹽害逆境

阿拉伯芥種子以稀釋十倍之漂白水消毒並播灑於 1/2 MS 固體培養基，以 4°C 低溫春化兩天後，於 24°C 12 小時光照/12 小時黑暗生長十天後，將小苗分別移至帶有 150 mM NaCl 及不帶有 NaCl 的 1/2 MS 固體培養基，觀察植株受鹽害抑制的生長情形。

15.2 種子萌發率測試

阿拉伯芥種子以稀釋十倍之漂白水消毒後，播灑於 1/2 MS 固體培養基，以 4°C 低溫春化兩天後，於 24°C 12 小時光照/12 小時黑暗生長。1/2 MS 固體培養基模擬鹽害逆境，分別帶有 100 mM 或 150 mM 的 NaCl，完全不額外添加鹽類的 1/2 MS 固體培養基為測試種子萌發率的對照組。

15.3 乾旱逆境

將轉植株阿拉伯芥種子與野生株或單純轉殖載體之阿拉伯芥播種於同一個三英吋的土盆，土的比例為 1:2=荷蘭土:根基旺，待植株生長三周後，停止澆水兩周再重新恢復澆水，觀察植株是否恢復生長。

15.3 青枯病菌接種

植物材料為三周大之阿拉伯芥。青枯病菌菌株 RD15 由 -80°C 冰箱劃到 TTC 固體培養基，28°C 培養兩天後，隨機挖取菌落以 523 液體培養基在 28°C 搖晃培養一天，再將菌液塗抹於 523 固體培養基，28°C 培養一天後以無菌的去離子水洗下菌落，調整為 OD₆₀₀=0.3 的菌液。每棵阿拉伯芥澆灌 10 mL 青枯病菌菌液，接種青枯病菌後植物移至 26°C 光照/26°C 黑暗的生長箱，一周後開始紀錄植物萎凋級數，阿拉伯芥萎凋分級如下，Level 0：無明顯病徵；Level 1：25%的葉片萎凋；Level 2：50%的葉片萎凋；Level 3：75%的葉片萎凋；Level 4：葉片完全萎凋。

15.3 軟腐病菌接種

植物材料為三周大阿拉伯芥。軟腐病菌由-80°C 冰箱劃到 523 固體培養基，28°C 培養一天後，隨機挖取菌落以 523 液體培養基在 28°C 搖晃培養一天，再將菌液塗抹於 523 固體培養基，28°C 培養一天後以無菌的去離子水洗下菌落，調整為 OD₆₀₀=0.001 的菌液。以針頭將每棵植株的一片葉片刺出一個傷口，將 10 μL 軟腐病菌菌液滴在傷口上，隔天針對感染程度記錄病徵級數，病徵級數依據 Higashi *et al.* 2008 來分類，Level 0：無明顯病徵；Level 1：接種部位有些微水浸狀病徵；Level 2：葉部出現明顯水浸狀病徵。

16. 生物資訊分析與統計分析

SIZFP 蛋白質氨基酸序列中的保守序列(conserved domain)是利用 NCBI 網站中附設的軟體所分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。Subcell μ Lar localization 實驗前是利用 WoLF PSORT 分析 TC122455 在細胞中可能座落的位置(<http://wolfpsort.org/>)。

青枯病菌量的濃度是利用 SAS Proc Mixed (SAS Institute)做統計分析。比較 empty pTRV2 vector 感染的對照組與靜默特定基因後的番茄中菌量的濃度，以 Student *t*-test 統計確認是否有顯著差異。

第三章 結果

1. VIGS 基因靜默之效率檢測

番茄進行 VIGS 農桿菌注射後第 15 天，收取番茄莖基部並抽取其 RNA 反轉錄為 cDNA，利用半定量 RT-PCR 檢測 VIGS 靜默特定目標基因的效率。各個基因半定量 RT-PCR 使用之引子列於附錄一，番茄 *Ubiquitin 3 (Ubi3)* 為 RNA 定量之對照組。檢測其中七個基因之 RNA 產物，與接種 empty pTRV2 vector 的控制組比較後，發現 *RAV2*、*SIZFP*、*MAPK*、*WRKY53*、*MTR*、*NABP* 以及 *Calmodulin-7* 等基因之 RNA 產物有不同程度的下降(圖一)，顯示在番茄中成功靜默目標基因使其表現量下降，然而 *ERF5* 之 RNA 產物並沒有下降。

2. VIGS 靜默特定基因後使番茄對抗青枯病菌能力下降

先前研究顯示，*AtNPR1* 大量表現之轉殖番茄可增強其廣效抗病能力(Lin *et al.*, 2004)，而 *CBF1* 大量表現之轉殖番茄可增強耐旱及耐鹽能力(Hsieh *et al.*, 2002)，利用 DNA 微陣列分析發現此轉殖番茄中一群會受 *AtNPR1* 或 *CBF1* 誘導而表現量上升的基因，將這群基因選出進行 VIGS 實驗。依照番茄基因資料庫 (Tomato expression database) 提供之 cDNA 全長序列設計引子，利用 PCR 增幅專一性片段，裝載到 TRV2 vector 並轉型入農桿菌中，利用農桿菌感染七天大的抗青枯病番茄品系 H7996，十天後即可產生 VIGS 靜默番茄特定基因的效果。*Phytoene desaturase (PDS)* 為合成胡蘿蔔素(carotenoid)的重要酵素，靜默 *PDS* 會造成番茄葉部白化區塊產生，以此為 VIGS 效率的對照組(圖二，A)。結果顯示 TRV 感染會稍微抑制番茄的生長，除此之外，*calmodulin-7* 被靜默後番茄呈現葉片向下彎曲，葉片黃化之外表形；*nucleic acid binding protein* 靜默後，真葉生長方向不自然扭曲(圖二，A)，其餘基因被靜默後並不會對番茄的生長與發育造成影響。

進一步接種青枯病菌進行番茄抗病性分析，L390 感病品系番茄在接種青枯病菌三天後出現萎凋的病徵，並在第五天全葉完全萎凋，偵測菌量在莖部與莖基部皆可達到 10^9 CFU g⁻¹。另外靜默 *RAV2*、*SIZFP*、*PGIP* 以及 *nucleic acid binding*

*protein (NABP)*使抗病品系番茄 H7996 對抗青枯病菌能力下降(圖二, B), 於接菌後第五天呈現萎凋之外表型。檢測植株內青枯病菌濃度後, 發現在靜默 *SIZFP*、*RAV2*、*NABP* 及 *PGIP* 之番茄的莖基部與莖部, 青枯病菌濃度比接種 empty pTRV2 vector 的番茄對照組來的高, 以 Student *t*-test 統計分析後顯示有顯著差異(表一)。

3. 番茄接種青枯病菌後之基因表現分析

為了檢測 VIGS 實驗篩選出的可能防禦基因(附錄一, 表一)是否受青枯病菌感染所誘導, 收取番茄 H7996 品系澆灌青枯病菌菌液與去離子水後, 第 0、6、12、24 以及 48 小時的番茄莖基部組織, 並抽取莖基部組織 RNA 反轉錄為 cDNA, 以半定量方式檢測前人已知會受青枯病菌誘導表現的指標基因 *TSRF1* (Zhang *et al.*, 2004), 發現在接種青枯病菌後 24 小時與 48 小時, *TSRF1* 表現量比起澆灌去離子水之對照組為高(圖三), 因此認定我們收取的樣本成功接種青枯病菌。

Real-time PCR 檢測結果發現, 比起澆灌去離子水之對照組, 一些基因受青枯病菌誘導有較高的表現量, 另一群基因誘導倍率較低, 分別如下述: *SIZFP* 的表現量分別在接種青枯病菌後第 6 小時和 24 小時上升 2 倍或 3 倍左右(圖四, A); *SICLL* 接種青枯病菌後 24 到 48 小時表現量上升 10 倍以上(圖四, B); *RAV2* 接種青枯病菌後第 12 小時表現量上升 3 倍而第 24 小時上升 8 倍(圖四, C); *expression protein* 接種青枯病菌後第 24 小時表現量上升 5 倍(圖四, D); *AAA-type ATPase* 的表現量分別在接種青枯病菌後第 6 小時和 48 小時上升 3 倍或 2 倍左右(圖四, E); *CCS*、*SIRLI2* 及 *snRNP* 則是分別在特定的時間點觀察到表現量上升 2 倍左右(圖四, F-H); *ERF5* 的表現量則十分不穩定, 並無特別之規律可言(圖四, I)。

4. *SIZFP*-cDNA 之全長調取

番茄 *SIZFP* (基因序號: TC122455)之 cDNA 全長取自 Tomato expression database 網站, 為 2097 bps, 利用 Vector NTI 分析 *SIZFP* 的開放譯讀框(open reading frame, ORF)為 1653 bps, 轉譯後擁有 551 個蛋白質氨基酸序列約 60kDa。以 NCBI

網站作序列比對，發現阿拉伯芥中有三個與 *SIZFP* 類似的蛋白質，保守序列 (conserved domain) 為 Zinc finger domain 中的 C3HC4-RING domain (圖五)。利用番茄 H7996 品系之 Total RNA 反轉錄為 cDNA 後，以聚合酶連鎖反應增幅 *SIZFP* 之 ORF，再用 TA clone 方式裝載於 pCR8[®]/GW/TOPO[®] vector 載體，以載體上引子定序後確定序列與資料庫之序列相同無誤。

5. 水楊酸、乙烯及茉莉酸處理番茄後之 *SIZFP* 表現分析

由於先前的研究中發現 *SIZFP* 會在 *AtNPR1* 過量表現的轉殖番茄中大量表現，表示 *SIZFP* 的表現量間接受到 *AtNPR1* 的調控，已知 *AtNPR1* 包含在水楊酸調控的植物防禦訊息傳導路徑，為了進一步確認 *SIZFP* 是否同樣受到水楊酸調控，因此對番茄 H7996 品系處理水楊酸。將水楊酸均勻噴灑在葉片後，收取 0、1、2、4、8 以及 24 小時的葉子組織並抽取 RNA 反轉錄為 cDNA。利用已知會被水楊酸誘導的基因 *Pti4* (Gu *et al.*, 2000) 當作對照組，發現 *Pti4* 在番茄處理水楊酸後 1 小時大量表現，之後 2、4、6、8 小時表現量慢慢降低，24 及 36 小時後表現量回復到與 0 小時的對照組相似的表現量(圖六，A)，*Pti4* 的表現量被誘導證實本實驗水楊酸處理有效。*SIZFP* 的表現量在水楊酸處理後 1 小時被抑制，之後抑制效果減緩表現量慢慢回復，但到第 8 小時表現量再度降低，36 小時後表現量又逐漸回復到與 0 小時的對照組相似的表現量(圖六，B)。

為了進一步確認 *SIZFP* 是否參與其他植物荷爾蒙調控的防禦反應，將三周大番茄處理乙烯前驅物 ethephon 後，檢測 0、1、2、4、8 以及 24 小時的 *SIZFP* 表現量，結果顯示 *SIZFP* 表現量在處理 ethephon 後隨時間下降，在第 4 小時表現量最低，第 24 小時後表現量慢慢恢復到 0 小時對照組的表現量(圖七，B)。*Pti4* 為已知會被水楊酸誘導的基因，做為番茄處理 ethephon 的對照組(圖七，A)。除水楊酸與乙烯，番茄處理茉莉酸後 0、1、2、4、8 以及 24 小時的表現量並無受到明顯的影響而改變(圖八，B)，*WIPI-2* 為已知會被茉莉酸誘導的基因(van Schie *et al.*, 2007)，做為番茄處理茉莉酸的對照組(圖八，A)。

6. SIZFP 可能位在植物細胞骨架上

為研究 SIZFP 在植物細胞中表現的位置，所以利用線上軟體 Wolf PSORT (<http://wolfsort.org/>) 預測，預測結果 SIZFP 與 PRH (At4g29940) 有 15% 相似，PRH (pathogenesis-related homeodomain protein) 已知會進入細胞核，所以推測 SIZFP 在細胞中坐落的位置可能是細胞核，但 SIZFP 的序列分析並沒有 NLS (nuclear localization sequence)。原生質體實驗中發現，用 p2FGW7 單獨表現 GFP 之原生質體對照組螢光會充滿整顆細胞(圖九，A)，而利用 CaMV 35S promoter 過量表現 GFP-SIZFP 重組螢光蛋白到阿拉伯芥原生質體後，發現 SIZFP 在細胞中呈現絲狀分布，利用 SIZFP-GFP 的重組螢光蛋白驗證也得到絲狀分布的結果(圖九，B)。微管標示蛋白(CFP-MAP4)與微絲標示蛋白(talin-YFP)單獨表現在原生質體時會呈現不同樣式的絲狀分布(圖九，C、D)，進一步利用 CFP-MAP4 或 talin-YFP 與 GFP-ZFP 融合蛋白同時表現到阿拉伯芥原生質體後發現，GFP-SIZFP 在細胞中表現的位置與 CFP-MAP4 有部分重疊(圖九，E)，與 talin-YFP 表現位置無法完全的配合(圖九，F)，因此推測 SIZFP 於阿拉伯芥原生質體表現位置可能是細胞骨架中的微管組織。

7. 阿拉伯芥轉殖株之篩選與分子檢驗

以 *CaMV 35S* promoter 過量表現 *SIZFP* 於阿拉伯芥哥倫比亞品系，抗殺草劑基因(Bar)為轉殖載體 pEarleyGate 201 用的篩選標記，T1 plants 以殺草劑篩選後存活 42 棵，以 Genomic PCR 確認插有轉殖基因的殖株留下收取子代。T2 植株用殺草劑篩選後依照分離率確認 3:1 存活比例的轉殖株為一個轉殖基因插入，分別收取種子後，T3 轉殖株再以殺草劑確認完全存活者為 Homozygous。選取 empty pEarleyGate 201 轉殖株、野生型阿拉伯芥以及 7 個 *35S::SIZFP* homozygous 轉殖株，分別抽取葉部 RNA 後反轉錄為 cDNA，利用 RT-PCR 方式檢測 *SIZFP* 之 RNA 是否大量表現於轉殖株中，結果發現控制組的 empty pEarleyGate 201 轉殖株及野生型阿拉伯芥沒有 *SIZFP* 表現，而 7 個 *SIZFP* 轉殖阿拉伯芥皆有 *SIZFP* 表現，

其中又以編號第 3 號及 36 號的 35S::*SIZFP* 轉植株 RNA 表現量為高(圖十)。觀察轉植株外表是否與野生型及轉殖空載體的阿拉伯芥有差異，結果顯示轉植株在一般情況下的生長速率、葉片的外觀並沒有改變(圖十一)。

8. 過量表現 *SIZFP* 增加阿拉伯芥青枯病菌的發病速率

為檢測 35S::*SIZFP* 轉植株對青枯病菌的抗病性，而進行青枯病菌接種測試。阿拉伯芥種子消毒並置於 1/2 MS 培養七天後移至土盆，待阿拉伯芥生長三到四周大時進行青枯病菌接種測試其抗病性，每個 line 各二十棵植株，每棵植株接種 10 mL 菌液($OD_{600}=0.3$)，結果顯示，35S::*SIZFP* 與野生型及轉殖空載體的部分植株在接種青枯病菌後第 7 天出現萎凋病徵，且各個 line 發病速率不盡相同，於第 12 天後登記植株萎凋級數並比較實驗組與對照組的差異，發現 35S::*SIZFP* 轉植株萎凋級數達到第四級完全萎凋的植株數量高於 30%，而野生型及轉殖空載體的阿拉伯芥對照組只有 10% 左右(圖十二)，顯示 *SIZFP* 會增加阿拉伯芥的發病機率。

9. 過量表現 *SIZFP* 未顯著影響阿拉伯芥對軟腐病菌的抗性

為檢測 35S::*SIZFP* 轉植阿拉伯芥對其他重要病害的耐受性，將三周大阿拉伯芥以葉片滴菌法接種軟腐病菌測試其抗病性，將感染程度分成 0-2 三個級數(圖十三)。結果顯示接種軟腐病菌後 12 小時，阿拉伯芥葉子出現不同程度感染之水浸狀軟腐病徵，在感染級數上，35S::*SIZFP* 轉植株與對照組皆屬於第二級數嚴重發病的植株數量為 40%-60% 左右，而合併一級與二級病徵的發病植株數量後實驗組與對照組皆高達 80% 以上有病徵，並無太大差別。另外葉片滴菌法接種軟腐病菌後 24 小時則是每棵植株都會出現嚴重的軟腐病徵(data not shown)。

10. 過量表現 *SIZFP* 稍微增加阿拉伯芥之鹽害耐受性

為了檢測 35S::*SIZFP* 轉殖阿拉伯芥對鹽害逆境的耐受性，將十天大的阿拉伯芥小苗由 1/2 MS 移到帶有 150 mM NaCl 之 1/2 MS 後，於第四天可觀察到葉

子邊緣白化現象，且所有植株開始呈現真葉捲曲的現象，顯示鹽害逆境產生效果。鹽害處理七天後，大部分野生型以及轉殖空載體的阿拉伯芥呈現白化死亡的外表型，而 35S::*SIZFP* 轉殖阿拉伯芥整體白化死亡的比例則比較不多，顯示較高的抗鹽能力(圖十四，A)。進一步檢測葉綠素的含量可發現，一般正常生長在 1/2 MS 上的阿拉伯芥，35S::*SIZFP* 轉植株與野生型及轉殖空載體的控制組比起來，葉綠素含量並無太大差異，而處理鹽害逆境後，35S::*SIZFP* 轉植株的葉綠素含量，會稍微高於野生型及轉殖空載體的阿拉伯芥(圖十四，B)，表示 35S::*SIZFP* 轉植株在鹽害逆境中生長的情形比對照組來的好，擁有較好的鹽害耐受性。

為了測試 35S::*SIZFP* 在鹽害逆境中種子的萌發情況，將阿拉伯芥種子消毒後播灑於含有 100 mM 或 150 mM NaCl 的 1/2 MS 固體培養基，兩天後計算萌發率。在一般的 1/2 MS 固體培養基上，35S::*SIZFP* 轉植株與對照組阿拉伯芥種子萌發率皆為 100% 左右，而在處理鹽害逆境 100 mM 時，對照組阿拉伯芥種子萌發率為 30%-40% 之間，兩個 35S::*SIZFP* 轉植株萌發率分別是 70% 與 38%，結果顯示其中一個 35S::*SIZFP* 轉植株在 100 mM NaCl 鹽害中萌發比率高於野生型以及轉殖空載體的阿拉伯芥，而濃度 150 mM NaCl 的 1/2 MS 固體培養基則無法使大部分的種子正常的萌發，實驗組與對照組萌發比率皆低於 20% (圖十五)。

12. 乾旱逆境測試顯示 *SIZFP* 未顯著影響植物的耐旱性

為檢測過量表現 *SIZFP* 是否影響阿拉伯芥對非生物性逆境的耐性，而進行乾旱逆境測試。阿拉伯芥生長於土盆中三到四周後(圖十四，A)，停止澆水兩週，再重新澆水並觀察兩天(圖十六，B)。少量植株復水後可恢復生長，大部分植株呈現乾死狀態，復水後兩天計算存活率後發現，35S::*SIZFP* 轉植株與野生型及轉殖空載體的阿拉伯芥存活率都大概是百分之二十左右(圖十六，C)，並無太大差異。在停止澆水的過程中，所有植株呈現慢慢乾枯死亡的外表型，先後次序並無分別，顯示 35S::*SIZFP* 轉植株對乾旱的耐受性並不受影響。

第四章 討論

1. 靜默番茄中特定基因後造成番茄外表型改變或降低對抗青枯病菌的能力

以往為了研究番茄特定基因的功能，常常需要花費大量時間建構突變株，因此發展出VIGS的技術。現今VIGS已經被廣泛使用在多種植物種類，包括番茄、菸草以及阿拉伯芥等常見的模式植物。利用VIGS技術，已有多篇文獻發現一些參與植物對抗環境逆境的重要基因(Senthil-Kumar *et al.*, 2008)。在青枯病的研究上，也有文獻指出靜默掉small heat shock protein 17 (shsp17)後的煙草對抗青枯病菌的能力大幅下降(Maimbo *et al.*, 2007)，顯見VIGS研究植物重要防禦基因的可行性。

本篇論文將DNA微陣列分析後所發現的，一群可能參與番茄對抗青枯病菌的基因進行VIGS實驗，其中發現*SIZFP*、*RAV2*、*Nucleic acid binding protein*靜默後的番茄接種青枯病菌後呈現萎凋之外表型(圖二，B)，但實際上的比例並不高，推測是因為樣本中每棵番茄個體抗病性的差異所導致，且因為人工注射農桿菌的方式進行VIGS，可能在注射過程中無法使每棵番茄同樣接受到一定量的農桿菌，促使VIGS效率在每棵番茄有不同程度的影響，導致病徵不一致。進一步檢測菌量後發現一些特定基因靜默後體內青枯病菌濃度上升，顯示這些基因可能共同扮演番茄對抗青枯病菌的防禦反應；依最近的研究指出，番茄對抗青枯病菌的防禦反應，可能同時包括水楊酸、茉莉酸以及乙烯防禦路徑中一些重要基因的參與(Chen *et al.*, 2009)，突顯出青枯病菌與植物間複雜的作用機制。基於以上原因，單獨靜默一個基因可能無法完全降低抗病番茄對抗青枯病菌的能力，以致沒有穩定的萎凋性狀出現。

VIGS實驗中也針對番茄的轉錄因子*WRKY53*進行研究，DNA微陣列顯示*WRKY53*在*AtNPR1*轉殖番茄中會受*AtNPR1*誘導大量表現，文獻也顯示*WRKY53*會受病原菌以及水楊酸誘導(Dong *et al.*, 2003)，但是VIGS結果顯示*WRKY53*靜默之番茄其對抗青枯病菌的能力並無下降，可能是因為*WRKY*轉錄因子為gene family，會有功能性冗餘(functional redundancy)的影響，所以無法用VIGS的方式

突顯此類基因的功能，同樣的MAPK這類基因也可能受到冗餘的效果而無法展現預期的結果。

在VIGS實驗中，菌量檢測顯示番茄*calmodulin-7*似乎與對抗青枯病菌無關，然而*calmodulin-7*靜默之番茄出現葉片彎曲、葉脈黃化及生長矮小的有趣外表型(圖二，A)，顯示*calmodulin-7*在番茄的生長發育中扮演重要角色，以往研究顯示阿拉伯芥之*calmodulin-7*過量表現轉植株會增進幼苗光反應發生型態的性狀(Hyperphotomorphogenic growth)，但*calmodulin-7*之突變株並不會影響阿拉伯芥的外表型(Kushwaha *et al.*, 2008)，然而本論文中利用VIGS靜*calmodulin-7*卻可以造成番茄出現生長受阻的情況，這可能是由於不同物種間*calmodulin-7*扮演功能不盡相同，且由於番茄之基因體並未完全定序，在設計VIGS片段上只能以現有資料庫設計專一片段，無法完全避免有cosilencing的可能性，故靜默*calmodulin-7*也有可能同時靜默其他未知的相似基因，導致靜默*calmodulin-7*出現與阿拉伯芥突變株不同的影響。

2. 青枯病菌誘導番茄特定基因之表現量上升

在基因表現分析上，本論文使用番茄中會受青枯病菌所誘導的 *TSRF1* 為接菌指標，結果顯示在兩批不同的重複實驗中，*TSRF1* 於接種青枯病菌後第 24 小時以及 48 小時大量表現(圖三)，與文獻中的結果相符，但明顯的在處理一般去離子水的番茄樣品中，*TSRF1* 表現量也有相對上升，由於 *TSRF1* 是隸屬於乙烯調控的 *ERF* 基因家族，許多文獻顯示許多 *ERF* 基因家族中的基因會受乾旱逆境所誘導，所以推測在接種青枯病菌及去離子水後的後面時間點，儘管土盆中土壤表面保持濕潤，但隨著水份流失植物可能感受到缺水而誘導一些基因的表現上升。

分析各基因的表現後，顯示*curculin-like lectin (SICLL)*、*RAV2*等基因受到青枯病菌誘導而大量表現(圖四)。*SICLL*在阿拉伯芥中有四個相似的homologs，關於*SICLL*的防禦功能仍然不是非常清楚，目前僅知lectin與真菌的孢子分裂及生長

有關聯(Barkai-Golan *et al.*, 1978; Sharon and Lis, 2004); 麥麩蠅(Hessian fly)的幼蟲會被雪花蓮(snowdrop)的lectin抑制生長(Fitches *et al.*, 2004; Majumder *et al.*, 2004; Hogervorst *et al.*, 2006; Subramanyam *et al.*, 2008)。由於lectin在植物對抗病菌的研究上仍然缺乏，所以*SICLL*在番茄對抗青枯病菌中扮演的功能有進一步研究的價值所在。

RAV2 (Related to *ABI3/VP1*)在分類上屬於*AP2* (*APETALA2*)轉錄因子家族(Wu *et al.*, 2008)。*AP2*家族中的*ERF*已被廣泛研究，在植物中會參與鹽害、乾旱、寒害等缺水逆境的反應(Wu *et al.*, 2008)；*ERF*家族也參與植物對抗病原菌的反應，例如*ERF1*、*Pti4*以及*AtERF1*會增強植物抗病且受到植物荷爾蒙及病原菌的誘導(Gutterson and Reuber, 2004)。以上文獻證實有許多*AP2*轉錄因子在植物對抗逆境扮演重要角色。其他*AP2*轉錄因子的研究包括辣椒的*RAV1*曾被發現會受 *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines* 誘導而表現(Kim *et al.*, 2005)，而*RAV2*在植物遭遇病原菌的反應上則未被報導，本論文實驗顯示番茄*RAV2*會受到青枯病菌誘導表現，推測*RAV2*轉錄因子可能參與調控植物下游防禦反應有關。

3. *SIZFP*表現量受到青枯病菌及水楊酸調控

SIZFP 為本篇論文選擇深入研究的基因，基因表現分析中顯示，接青枯病菌後第 6 小時以及 24 小時 *SIZFP* 表現量較接水之控制組來的高(圖四)，顯見青枯病菌之感染誘導 *SIZFP* 在早期及後期表現，但因為實驗收取 sample 略過接完菌 0 到 6 小時的時間點，所以無法免除 *SIZFP* 可能在更早的時間點有表現量上升的可能性。另外在第 48 小時的時間點可發現，*SIZFP* 表現量不管在接菌或接水的樣本皆遠大於 0 小時的時間點，顯見 *SIZFP* 可能不只參與植物對抗青枯病菌的反應，植物可能在實驗期間也感受感受到其他環境因子例如乾旱的影響使得 *SIZFP* 表現趨勢不穩定。

在前人 DNA 微陣列的分析中發現，*AtNPR1* 過量表現轉植番茄，*SIZFP* 的表現量會提高約 2.1 倍，RT-PCR 也顯示 *AtNPR1* 過量表現番茄中 *SIZFP* 被大量誘

導表現(附錄二)。而在水楊酸處理後的番茄中卻發現 *SIZFP* 的表現會受到高度抑制(圖六, B)。過去研究指出, 植物體中存在有負回饋抑制路徑去調控水楊酸的產量, *npr1* 阿拉伯芥突變株會無法對水楊酸產生正常反應, 當植株受到感染時, 水楊酸產量以及水楊酸的合成酵素 *ICS1* 表現量都會高於野生型的阿拉伯芥 (Delaney *et al.*, 1995), 且 *npr1* 突變株對水楊酸的耐受性下降, 額外處理水楊酸會抑制 *npr1* 突變株的正常生長(Cao *et al.*, 1997), 另外由於許多突變株的研究發現水楊酸大量累積會造成植物本身矮小生長受抑制的情況(Heil and Baldwin, 2002), 因此推測 *NPR1* 的存在能幫助調控水楊酸的銜定, 負回饋機制可以避免水楊酸過量產生(Durrant and Dong, 2004)。

本論文發現 *SIZFP* 會被水楊酸抑制(圖六, B), 而在前人研究中會受 *AtNPR1* 所誘導, 推測因為 *AtNPR1* 過量表現導致水楊酸有部分回饋抑制產生, 從而降低水楊酸對一些下游基因的調控, *SIZFP* 可能因而不受水楊酸之抑制而表現。另外, 研究指出番茄對抗青枯病菌的反應具有複雜的分子機制, 可能同時包含水楊酸、乙烯、茉莉酸等物質誘導的防禦機制及 MAPK 的訊息傳遞鍊參與, 這些不同的防禦路徑, 可能經由反應的時間點先後次序不同來達到防禦青枯病的目的 (Chen *et al.*, 2009; Hase *et al.*, 2008), 更多的植物賀爾蒙處理實驗將可解釋 *SIZFP* 在番茄中被調控的確實機制。

4. *SIZFP* 可能位於植物細胞的細胞骨架

利用阿拉伯芥原生質體短暫表現 *SIZFP* 發現其坐落在細胞骨架上, 且表現位置與微管的標示蛋白 microtubule-associated protein 4 (MAP4) 大致吻合(圖九, E), 但 MAP4 在原生質體中分部似乎更廣泛, 推測是因為不同物種來源導致, MAP4 是屬於哺乳類動物老鼠的蛋白, 且 *SIZFP* 是一個番茄的蛋白, 同樣不屬於阿拉伯芥本身自有的蛋白, 故這些蛋白質表現位置可能無法完全表示植物細胞中微管的分布, 但可確定的是, 與 GFP only 控制組比較, 番茄 *SIZFP* 確實可以跨越物種在阿拉伯芥中表現並呈現其特殊的位置, 且 GFP 融合在 *ZFP* 的 N-terminal 或者

C-terminal 皆不會影響 SIZFP 的表現位置，顯示 SIZFP 坐落於細胞骨架並不是因為 GFP 而影響到其表現位置。由於 SIZFP 與現有已知的微管蛋白，包括 tubulin、MAP4 等胺基酸序列並不相似，且不具有已知的 microtubule binding domain，所以推測 SIZFP 帶有新型的蛋白質區域使其與微管產生連結，未來應用 deletion assay 逐步篩選，可能得知 SIZFP 上扮演關鍵角色的胺基酸序列為何。

細胞骨架中的微管與微絲在分布上皆呈現絲狀分布，因此在原生質體的實驗中另外還加入了微絲(actin filament)的標示蛋白 talin-YFP，結果顯示 GFP-SIZFP 與 talin-YFP 表現位置不盡相同(圖九，F)，間接證實 SIZFP 可能位在另一種細胞骨架微管上，為了進一步確認 SIZFP 是位於微管上，未來可採用微管的抑制劑 oryzalin 或 amiprophosmethyl 以及微絲的抑制劑 latrunculin B，以抑制劑處理表現 GFP-SIZFP 的阿拉伯芥原生質體，若 SIZFP 在微管的抑制劑作用下無法呈現絲狀分布，則可證明 SIZFP 的確切位置。

5. 35S::*SIZFP* 轉殖株生長正常

過往文獻指出，持續大量表現各種植物防禦基因，會對植物生長造成不同程度上的抑制作用，例如 *DREB1a* 過量表現阿拉伯芥可增強對抗非生物性逆境的能力，卻會嚴重抑制植株生長(Kasuga *et al.*, 1999)；*CBF3* 過量表現阿拉伯芥可增加對寒害的耐受性，卻使植株生長矮小且開花延緩(Gilmour *et al.*, 2000)；然而也有文獻指出，過量表現 *AtNPR1* 轉殖番茄可增加廣效抗病能力，在外部形上卻不會與野生株番茄有差異(Lin *et al.*, 2004)；*TSRF1* 過量表現之煙草對抗青枯病菌的能力上升，轉殖株在生長上並不會受到抑制(Zhang *et al.*, 2004)；基於防禦基因可能對轉殖株外部形造成影響的原因，對 35S::*SIZFP* 進行外部形的觀察，結果顯示轉殖株生長並無受到抑制，且外部形並無改變(圖十一)。由於目前只粗略觀察外觀變化，往後可在針對細節例如表皮細胞的大小或形狀進行觀察，因為 SIZFP 可能是一個微管上的蛋白質，文獻指出，同樣位於微管上的蛋白質 Casein kinase 1-like 6 過量表現會影響阿拉伯芥表皮細胞的大小及形狀(Ben-Nissan *et al.*,

2008)；另外由於 AtMAP 會影響細胞中微管的排列(Li *et al.*, 2007)，因此 SIZFP 也可能影響細胞中骨架的分佈，未來利用 GFP 融和蛋白建構轉殖株可細部分析 SIZFP 於細胞層級對植物造成的影響。

6. 過量表現 SIZFP 可能造成阿拉伯芥轉殖株對青枯病菌的抵抗能力下降

接種青枯病菌後顯示 35S::*SIZFP* 轉殖阿拉伯芥發病速率比野生型及轉殖空載體的阿拉伯芥來得快(圖十二)，而 TRV-VIGS 實驗顯示靜默 *SIZFP* 後番茄抗青枯病菌能力下降(圖二，B；表一)，這樣的結果似乎前後矛盾，推測是因為 *SIZFP* 的表現量必須維持在一個平衡的狀態，任何太過量的變動會造成訊息傳導路徑上平衡的失控，導致預期抗病的結果相反，近期研究也曾發現類似案例，像阿拉伯芥 *ERF104* 過量表現轉殖株與 *erf104* 突變株同樣會造成植物感病性增加，植物體內菌量上升(Bethke *et al.*, 2009)，另外由於水楊酸以及 ethephon 處理會抑制 *SIZFP* 的表現量，綜合接菌結果 35S::*SIZFP* 轉殖阿拉伯芥抗青枯病性下降，所以也不排除 *SIZFP* 可能扮演防禦反應負調控者的角色。另外值得注意的，*SIZFP* 是屬於番茄的蛋白質，在胺基酸序列比對上與阿拉伯芥最像的蛋白質 At5g10650 的相似性(similarity)為 55%而一致性(identities)為 39%，因此轉殖外來物種的蛋白質到阿拉伯芥中，並不一定能完全展現 *SIZFP* 的功能，且由於 VIGS 實驗是以番茄為材料而轉殖株抗病性測試是以阿拉伯芥為材料，文獻指出茄科作物面對青枯病菌時產生的分子機制反應與阿拉伯芥不會完全的等同(Lin *et al.*, 2008a; Robatzek *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007)，所以可能因為跨物種的關係而造成抗病性結果不如預期。針對此點，目前正以茄科的模式植物為背景去建構 35S::*SIZFP* 轉殖菸草(附錄三)，期望能更確切了解 *SIZFP* 的功能。

其他關於 35S::*SIZFP* 轉殖株抗病性測試的問題還有，轉殖株使用的 independent line 過少，未來增加更多不同 line 的 35S::*SIZFP* 轉殖株，可以更加確認 *SIZFP* 的功能。另外在接種青枯病菌的過程中，發現同一對照組或實驗組的植物萎凋情況並不非常一致，有些植物甚至不出現萎凋病徵，這可能是因為青枯病菌

菌量太低，且採取植物不斷根處理的方式所造成，未來可考慮調整接菌的濃度，或接種青枯病菌前，先斷根造成根部傷口，使青枯病菌感染植物的效率提升，或許能促使各個對照組或實驗組發病情況一致，進而顯現更大的差異性。

以現有資料分析 SIZFP 的可能功能，SIZFP 在分類上屬於鋅指蛋白中的 RING 蛋白，過去對 RING 蛋白的研究顯示，許多具有 RING domain 的蛋白很可能是 E3 ubiquitin ligases (Deshaies and Joazeiro, 2009)，因此 SIZFP 也可能具有 ubiquitin ligases 的活性。研究指出植物透過 ubiquitination 的過程可以調控許多其他的蛋白質，控制許多細胞的生理反應，在植物防禦反應中扮演非常重要的角色 (Devoto *et al.*, 2003; Goritsching *et al.*, 2007)；例如過量表現稻米中的 *OsRHCI* 到阿拉伯芥後可增加植物對抗 *pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 的能力 (Cheung *et al.*, 2007)；而過量表現 *OsBIRF1* 到菸草可同時增加植對生物性與非生物性逆境的耐受性 (Liu *et al.*, 2008)。儘管目前無法確認 SIZFP 在抗病反應中扮演的角色是正調控或負調控，未來仍可以透過 SIZFP 是否參與 ubiquitination pathway 來釐清 SIZFP 扮演的角色；在蛋白質分解的過程中 26S proteasome 負責分解被 ubiquitin 標定的蛋白，處理 MG132 可以抑制 26S proteasome 的活性，利用 MG132 處理 35S::SIZFP 轉殖株，倘若能恢復 35S::SIZFP 轉殖株的抗病性，則可以推論 35S::SIZFP 轉殖株抗病性降低是因為 SIZFP 影響到植物體內 ubiquitination pathway，進而影響植物對抗逆境的訊息傳導路徑。

除青枯病菌外，本論文還測試了 35S::SIZFP 轉殖株對軟腐病菌的抗性(圖十三)，在接種軟腐病的實驗中發現，以參考文獻的方式接種無法出現病徵，因此特意對植物葉子以針筒造成傷口在行接菌，卻發現所有植株發病情況都非常嚴重且快速，在一天內接種葉就可以出現完全軟腐的病徵，由於此方法造就的逆境可能太過劇烈，因此無法正確比較植株間之病害反應是否有差異性，今後可考慮改善接種的方式或調整軟腐病菌的濃度，以期更精準的觀察植物軟腐病徵發生的情況。

7. SIZFP 在鹽害中可能扮演的角色

鹽害測試顯示 35S::*SIZFP* 轉殖阿拉伯芥有較好的鹽害耐受性(圖十四)，唯差異度非常大，故未來必須放大樣本數以更加確認 *SIZFP* 是否確實幫助植物增加鹽害耐受性。另外在鹽害逆境中的種子萌發測試，兩個不同 line 的 35S::*SIZFP* 轉殖株呈現不同的抗性，由於目前所得到的 homozygous 35S::*SIZFP* 轉殖株只有兩株，未來應該增加不同 line 的轉殖株數量以確認 *SIZFP* 的功能。

由於 *SIZFP* 的表現位置是在植物的細胞骨架微管上，針對此點去推測 *SIZFP* 在非生物逆境中可能的功能，在文獻中發現，處理微管組織的聚合抑制劑會幫助阿拉伯芥在鹽害逆境中恢復其生長，而以藥物處理的方式增強微管的組成，則會促使阿拉伯芥對鹽害耐受性降低，顯示微管的重新組成排列會幫助植物更能生存在鹽害逆境中(Wang *et al.*, 2007)；在其他非生物逆境的測試中，利用 pronamide 使微管在短時間內被分解無法聚合，可以增加植株在低溫逆境中的存活率 (Abdrakhamanova *et al.*, 2003)，且耐寒品種的小麥對於破壞微管的藥物較為敏感 (Olinevich *et al.*, 2002)；另外滲透壓逆境會抑制植物的生長，同時會改變植物微管的組成與排列(Balancaflor and Hasenstein 1995)。到目前為止，已經有許多證據證明非生物性逆境會使植物的細胞骨架重新組織，本論文發現 *SIZFP* 位於細胞中的微管組織上，推測 *SIZFP* 可能會影響植物在逆境下微管的排列，以利植物的生長，目前已經建構 35S::*GFP-ZFP* 轉殖植物(附錄四)，再輔以各種逆境處理，可仔細檢視 *SIZFP* 在逆境下位置的改變，更加確認 *SIZFP* 在植物中可能扮演的功能。

8. 總結

本論文利用 VIGS 篩選及基因表現分析發現一些可能參與番茄抗青枯病菌的基因，且發現了一個帶有 RING domain 的蛋白質 *SIZFP* 可能位在植物細胞骨架的微管組織，過去文獻並沒有發現 RING 蛋白有能力連結在細胞骨架。透過過量表現 *SIZFP* 到阿拉伯芥中還發現，*SIZFP* 的表現量必須維持在平衡的狀態，*SIZFP* 表現量的變動可能會造成訊息傳導上平衡的失控，進而影響植物對逆境的反應。

參考文獻

- 郭如玉 (2004). *AtNPR1* 轉殖番茄之性狀分析及抗病機制研究。國立台灣大學植物科學研究所碩士論文。
- 陳永義 (2008). 番茄對抗青枯病菌之分子機制研究。國立台灣大學植物科學研究所碩士論文。
- Abdrakhamanova, A., Wang, Q.Y., Khokhlova, L., and Nick, P.** (2003). Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol* **44**, 676-686.
- Agarwal P.K., Agarwal P., Reddy M.K., Sopory S.K.** (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* **25**: 1263–1274.
- Apel, K., and Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373-399.
- Arnon, D.I.** (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts - Polyphenoloxidase in *Beta-Vulgaris*. *Plant Physiology* **24**, 1-15.
- Barkai-Golan, R., Mirelman, D., and Sharon, N.** (1978). Studies on growth inhibition by lectins of *Penicillia* and *Aspergilli*. *Arch Microbiol* **116**, 119-121.
- Baulcombe D.** (2004). RNA silencing in plants. *Nature*. **431**: 356-63.
- Ben-Nissan, G., Cui, W., Kim, D.J., Yang, Y., Yoo, B.C., and Lee, J.Y.** (2008). Arabidopsis casein kinase 1-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules. *Plant Physiol* **148**, 1897-1907.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P.J., Marco, Y., and 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. *Plant Cell* **20**, 2252-2264.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Poschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D., and Lee, J.** (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8067-8072.
- Blancaflor, E.B., and Hasenstein, K.H.** (1995). Growth and microtubule orientation of *Zea mays* roots subjected to osmotic stress. *Int J Plant Sci* **156**, 774-783.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. rev. plant physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.
- Bostock, R.M.** (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 545-580.
- Boyer, J.S.** (1982). Plant productivity and Environment. *Science* **218**, 443-448.
- Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E.** (2000). Responses to abiotic stresses. In W Gruissem, B Buchannan, R Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 1158–1249.
- Brigneti, G., Martin-Hernandez, A.M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D.C., Baker, B., and Jones, J.D.** (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J* **39**, 264-272.
- Cai, X.Z., Xu, Q.F., Wang, C.C., and Zheng, Z.** (2006). Development of a virus-induced gene-silencing system for functional analysis of the RPS2-dependent resistance signalling pathways in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **62**, 223-232.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X.** (1997). The

- Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**, 57-63.
- Chan, Y.L., Prasad, V., Sanjaya, Chen, K.H., Liu, P.C., Chan, M.T., and Cheng, C.P.** (2005). Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. *Planta* **221**, 386-393.
- Chellemi, D.O., Dankers, H.A., Olson, S.M., Hodge, N.C., and Scott, J.W.** (1994). Evaluating bacterial wilt-resistant tomato genotypes using a regional approach. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **119**, 325-329.
- Chen, Y.Y., Lin, Y.M., Chao, T.C., Wang, J.F., Liu, A.C., Ho, F.I., and Cheng, C.P.** (2009). Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiol Plant* **136**, 324-335.
- Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., and Luan, S.** (2002). Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 661-677.
- Cheung, M.Y., Zeng, N.Y., Tong, S.W., Li, F.W., Zhao, K.J., Zhang, Q., Sun, S.S., and Lam, H.M.** (2007). Expression of a RING-HC protein from rice improves resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in transgenic Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **58**, 4147-4159.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., and Zhu, J.K.** (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* **45**: 437-448.
- Ciftci-Yilmaz, S., and Mittler, R.** (2008). The zinc finger network of plants. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1150-1160.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 735-743.
- Constantin, G.D., Krath, B.N., MacFarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, I.E., and Lund, O.S.** (2004). Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant J* **40**, 622-631.
- Dealuney A.J., and Verma D.P.S.** (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* **4**: 215-223.
- Delaney, T.P., Friedrich, L., and Ryals, J.A.** (1995). Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6602-6606.
- Deng, X.W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A., and Quail, P.H.** (1992). COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell* **71**, 791-801.
- Denny, T.P.** (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In *plant-Associated Bacteria*, S.S. Gnanamanickam, ed (Dordrecht, The Netherlands: Skpringer Publishing), pp. 573-644.
- Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.** (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**, 399-434.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot* **55**, 205-212.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y.** (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in

- Arabidopsis thaliana is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. Proc Natl Acad Sci U S A. **99**, 2404-2409.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 8024-8029.
- Devoto, A., Muskett, P.R., and Shirasu, K.** (2003). Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. Curr Opin Plant Biol **6**, 307-311.
- Dhonukshe, P., Laxalt, A.M., Goedhart, J., Gadella, T.W.J., and Munnik, T.** (2003). Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. Plant Cell **15**, 2666-2679.
- Dinesh-Kumar, S.P., Anandalakshmi, R., Marathe, R., Schiff, M., and Liu, Y.** (2003). Virus-induced gene silencing. Methods Mol Biol **236**, 287-294.
- Dong, J., Chen, C., and Chen, Z.** (2003). Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. Plant Mol Biol **51**, 21-37.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. Annu Rev Phytopathol **42**, 185-209.
- Fitches, E., Edwards, M.G., Mee, C., Grishin, E., Gatehouse, A.M., Edwards, J.P., and Gatehouse, J.A.** (2004). Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. J Insect Physiol **50**, 61-71.
- Freemont, P.S.** (1993). The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. Ann N Y Acad Sci **684**, 174-192.
- Freemont, P.S.** (2000). RING for destruction? Curr Biol **10**, R84-87.
- Freemont, P.S., Hanson, I.M., and Trowsdale, J.** (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. Cell **64**, 483-484.
- Fuchs U, Damm-Welk C, Borkhardt A.** (2004). Silencing of disease-related genes by small interfering RNAs. Curr Mol Med. **4**: 507-17.
- Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D., and Thomashow, M.F.** (2000). Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. Plant Physiol **124**, 1854-1865.
- Goritschnig, S., Zhang, Y., and Li, X.** (2007). The ubiquitin pathway is required for innate immunity in Arabidopsis. Plant journal for cell and molecular biology. **v. 49, no. 3**, 540-551.
- Goritschnig, S., Zhang, Y., and Li, X.** (2007). The ubiquitin pathway is required for innate immunity in Arabidopsis. Plant J **49**, 540-551.
- Grimault, V., Anais, G., and Prior, P.** (1994). Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. Plant Pathology **43**, 663-668.
- Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J., and Martin, G.B.** (2000). Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. Plant Cell **12**, 771-786.
- Gutterson, N., and Reuber, T.L.** (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. Curr Opin Plant Biol **7**, 465-471.

- Hanson, P.M., Licardo, O., Hanudin, Wang, J.F., and Chen, J.** (1998). Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. *Plant Dis.* **82**, 74-78.
- Hase, S., Takahashi, S., Takenaka, S., Nakaho, K., Arie, T., Seo, S., Ohashi, Y., and Takahashi, H.** (2008). Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology* **57**, 870-876.
- Heil, M., and Baldwin, I.T.** (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends Plant Sci* **7**, 61-67.
- Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen, M., Soenderby, I.E., Sundar, S., Jarmolowski, A., Shirasu, K., and Lacomme, C.** (2005). Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiol* **138**, 2155-2164.
- Hernandez-Blanco, C., Feng, D.X., Hu, J., Sanchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sanchez-Rodriguez, C., Anderson, L.K., Somerville, S., Marco, Y., and Molina, A.** (2007). Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* **19**, 890-903.
- Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y.** (2008). Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **279**, 303-312.
- Hirsch, J., Deslandes, L., Feng, D.X., Balague, C., and Marco, Y.** (2002). Delayed Symptom Development in *ein2-1*, an *Arabidopsis* Ethylene-Insensitive Mutant, in Response to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **92**, 1142-1148.
- Hogervorst, P.A., Ferry, N., Gatehouse, A.M., Wackers, F.L., and Romeis, J.** (2006). Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. *J Insect Physiol* **52**, 614-624.
- Hsieh, T.H., Lee, J.T., Charng, Y.Y., and Chan, M.T.** (2002). Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol* **130**, 618-626.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., and Thomashow, M.F.** (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**, 104-106.
- Jaunet, T.X., and Wang, J.F.** (1999). Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* **89**, 320-327.
- Jensen, R.B., Jensen, K.L., Jespersen, H.M., and Skriver, K.** (1998). Widespread occurrence of a highly conserved RING-H2 zinc finger motif in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **436**, 283-287.
- Jimenez, R.F., Torres, P., Gunther, B., Morgado, E., and Jimenez, C.A.** (2004). Wavelet and Fourier analysis of ventricular and main arteries pulsations in anesthetized dogs. *Biol Res* **37**, 431-447.
- Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M.** (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549-552.
- Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T., and Liu, Y.C.**

- (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**, 309-312.
- Kasajima, I., Ide, Y., Ohkama-Ohtsu, N., Hayashi, H., Yoneyama, T., and Fujiwara, T.** (2004). A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**, 49-52.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* **17**, 287-291.
- Kim, S.Y., Kim, Y.C., Lee, J.H., Oh, S.K., Chung, E., Lee, S., Lee, Y.H., Choi, D., and Park, J.M.** (2005). Identification of a CaRAV1 possessing an AP2/ERF and B3 DNA-binding domain from pepper leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8ra by differential display. *Biochim Biophys Acta* **1729**, 141-146.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R.** (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* **12**, 1067-1078.
- Ko, J.H., Yang, S.H., and Han, K.H.** (2006). Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *Plant J* **47**, 343-355.
- Kobayashi, I., Kobayashi, Y., and Hardham, A.R.** (1994). Dynamic reorganization of microtubules and microfilaments in flax cells during the resistance response to flax rust infection. *Planta* **195**, 237-247.
- Kushwaha, R., Singh, A., and Chattopadhyay, S.** (2008). Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* **20**, 1747-1759.
- Lahaye T.** (2004). Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance; *Arabidopsis thaliana* RRS1-R and its interaction with *Ralstonia solanacearum* popP2. *Trends Plant Sci* **9**: 1-4.
- Li, H., Yuan, M., and Mao, T.** (2007). AtMAP65-1 binds to tubulin dimers to promote tubulin assembly. *J Biochem Mol Biol* **40**, 218-225.
- Lin, W.C., Lu, C.F., Wu, J.W., Cheng, M.L., Lin, Y.M., Yang, N.S., Black, L., Green, S.K., Wang, J.F., and Cheng, C.P.** (2004). Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Res* **13**, 567-581.
- Lin, Y.M., Chou, I.C., Wang, J.F., Ho, F.I., Chu, Y.J., Huang, P.C., Lu, D.K., Shen, H.L., Elbaz, M., Huang, S.M., and Cheng, C.P.** (2008). Transposon mutagenesis reveals differential pathogenesis of *Ralstonia solanacearum* on tomato and *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1261-1270.
- Lipka, V., and Panstruga, R.** (2005). Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 625-631.
- Liu, H., Zhang, H., Yang, Y., Li, G., Wang, X., Basnayake, B.M., Li, D., and Song, F.** (2008). Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene OsBIRF1 on regulation of growth and defense responses against abiotic and biotic stresses. *Plant Mol Biol* **68**, 17-30.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1391-1406.
- Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002). Virus-induced gene silencing in

- tomato. *Plant J* **31**, 777-786.
- Lopes C.A., Quezado-Soares A.M., Melo P.E.,** (1994). Differential resistance of tomato cultigens to biovars I and III of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis* **78**, 1091-1094.
- Lorenzo, O., and Solano, R.** (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 532-540.
- Mahajan, S., and Tuteja, N.** (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* **444**, 139-158.
- Mahalingam, V., Karvembu, R., Chinnusamy, V., and Natarajan, K.** (2006). Spectral, redox and catalytic studies of triphenylphosphine/triphenylarsine complexes of Ru(III) with N, O donor ligands derived from 2-hydroxy-1-naphthaldehyde and primary amines. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **64**, 886-890.
- Maimbo, M., Ohnishi, K., Hikichi, Y., Yoshioka, H., and Kiba, A.** (2007). Induction of a small heat shock protein and its functional roles in Nicotiana plants in the defense response against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol* **145**, 1588-1599.
- Majumder, P., Banerjee, S., and Das, S.** (2004). Identification of receptors responsible for binding of the mannose specific lectin to the gut epithelial membrane of the target insects. *Glycoconj J* **20**, 525-530.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U.** (2002). The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 637-646.
- Mauch-Mani, B., and Mauch, F.** (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 409-414.
- Mikhailova, N.** (2006). Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 69-79.
- Mukhtar, M.S., Deslandes, L., Auriac, M.C., Marco, Y., and Somssich, I.E.** (2008). The Arabidopsis transcription factor WRKY27 influences wilt disease symptom development caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant J* **56**, 935-947.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., Enju, A., and Shinozaki, K.** (2004). Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in Arabidopsis: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Mol Biol* **55**, 327-342.
- Olinevich, O.V., and Khokhlova, L.P.** (2002). Reorganization of the tubulin and actin cytoskeleton under acclimation and abscisic acid treatment of *Triticum aestivum* L. plants. *Tsitologiya* **44**, 532-544.
- Prior P., Grimault V., Schmit J.** (1994). Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: present status and prospects. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, pp 209–223
- Ratnayaka, H.H., Molin, W.T., and Sterling, T.M.** (2003). Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. *J Exp Bot* **54**, 2293-2305.
- Robatzek, S., Bittel, P., Chinchilla, D., Kochner, P., Felix, G., Shiu, S.H., and Boller, T.** (2007). Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Mol Biol* **64**,

539-547.

- Sanan-Mishra, N., Pham, X.H., Sopory, S.K., and Tuteja, N.** (2005). Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 509-514.
- Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N., and Freemont, P.S.** (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* **21**, 208-214.
- Senthil-Kumar, M., Govind, G., Kang, L., Mysore, K.S., and Udayakumar, M.** (2007). Functional characterization of *Nicotiana benthamiana* homologs of peanut water deficit-induced genes by virus-induced gene silencing. *Planta* **225**, 523-539.
- Senthil-Kumar, M., Rame Gowda, H.V., Hema, R., Mysore, K.S., and Udayakumar, M.** (2008). Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance. *J Plant Physiol* **165**, 1404-1421.
- Serrano, M., Parra, S., Alcaraz, L.D., and Guzman, P.** (2006). The ATL gene family from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* comprises a large number of putative ubiquitin ligases of the RING-H2 type. *J Mol Evol* **62**, 434-445.
- Sharon, N., and Lis, H.** (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**, 53R-62R.
- Shibaoka, H., and Nagai, R.** (1994). The plant cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 10-15.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 161-167.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F.** (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1035-1040.
- Subramanyam, S., Smith, D.F., Clemens, J.C., Webb, M.A., Sardesai, N., and Williams, C.E.** (2008). Functional characterization of HFR1, a high-mannose N-glycan-specific wheat lectin induced by Hessian fly larvae. *Plant Physiol* **147**, 1412-1426.
- Takabatake, R., Karita, E., Seo, S., Mitsuhashi, I., Kuchitsu, K., and Ohashi, Y.** (2007). Pathogen-induced calmodulin isoforms in basal resistance against bacterial and fungal pathogens in tobacco. *Plant Cell Physiol* **48**, 414-423.
- Takai, R., Matsuda, N., Nakano, A., Hasegawa, K., Akimoto, C., Shibuya, N., and Minami, E.** (2002). EL5, a rice N-acetylchitooligosaccharide elicitor-responsive RING-H2 finger protein, is a ubiquitin ligase which functions in vitro in co-operation with an elicitor-responsive ubiquitin-conjugating enzyme, OsUBC5b. *Plant J* **30**, 447-455.
- Takemoto, D., Maeda, H., Yoshioka, H., Doke, N., and Kawakita, K.** (1999). Effect of cytochalasin D on defense responses of potato tuber discs treated with hyphal wall components of *Phytophthora infestans*. *Plant Sci* **141**, 219-226.
- Thion, L., Mazars, C., Nacry, P., Bouchez, D., Moreau, M., Ranjeva, R., and Thuleau, P.** (1998). Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in ton 2 mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. *Plant J* **13**, 603-610.

- Thomashow, M.F.** (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 571-599.
- Torii, K.U., McNellis, T.W., and Deng, X.W.** (1998). Functional dissection of Arabidopsis COP1 reveals specific roles of its three structural modules in light control of seedling development. *EMBO J* **17**, 5577-5587.
- Torii, K.U., Stoop-Myer, C.D., Okamoto, H., Coleman, J.E., Matsui, M., and Deng, X.W.** (1999). The RING finger motif of photomorphogenic repressor COP1 specifically interacts with the RING-H2 motif of a novel Arabidopsis protein. *J Biol Chem* **274**, 27674-27681.
- Torres, M.A., and Dangel, J.L.** (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 397-403.
- Valentine, T., Shaw, J., Blok, V.C., Phillips, M.S., Oparka, K.J., and Lacomme, C.** (2004). Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. *Plant Physiol* **136**, 3999-4009.
- van Schie C.C.N., Haring M.A., Schuurink R.C.** (2007). Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Mol Biol* **64**, 251-263
- Vasse J., Danoun S., Trigalet A.** (2005). Microscopic studies of root infection in resistant tomato cv. Hawaii7996. In: Allen C, Hayward AC (eds) Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. APS Press St Paul MN pp 285-291
- Verma, A.J.D.a.D.P.S.** (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *plant journal* **4**, 215-223.
- Waditee, R., Bhuiyan, M.N., Rai, V., Aoki, K., Tanaka, Y., Hibino, T., Suzuki, S., Takano, J., Jagendorf, A.T., and Takabe, T.** (2005). Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1318-1323.
- Waigmann, E., and Zambryski, P.** (1994). Plasmodesmata - Gateways for Rapid Information-Transfer. *Current Biology* **4**, 713-716.
- Wang, C., Li, J., and Yuan, M.** (2007). Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **48**, 1534-1547.
- Wang, C.D., Hu, Y.L., Wei H., Yu, P.C., Che, T.T., Lin, Z.P.** (2004) Dehydrin gene transformed petunia showed strong resistance to drought stress. *Molecular Plant Breeding* **2**, 369-374.
- Wang J.F., Lin C.H.** (2005) Colonization capacity of *Ralstonia solanacearum* tomato strains differing in aggressiveness on tomatoes and weeds. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. APS St Paul Germany pp 73-79
- Wang, J.F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., and Grimsley, N.H.** (2000). Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 6-13.
- Wang, Y.S., Pi, L.Y., Chen, X., Chakrabarty, P.K., Jiang, J., De Leon, A.L., Liu, G.Z., Li, L., Benny, U., Oard, J., Ronald, P.C., and Song, W.Y.** (2006). Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell* **18**, 3635-3646.
- Wei, C.F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., Lin, N.C., Martin, G.B., Huang, H.C., and Collmer, A.** (2007). A *Pseudomonas syringae* pv.

- tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **51**, 32-46.
- Wu, L., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, X.C., and Huang, R.** (2008). Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiol* **148**, 1953-1963.
- Xu, R., and Li, Q.Q.** (2003). A RING-H2 zinc-finger protein gene RIE1 is essential for seed development in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **53**, 37-50.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (1993). Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet* **236**, 331-340.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J.** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* **2**, 1565-1572.
- Zeba, N., Isbat, M., Kwon, N.J., Lee, M.O., Kim, S.R., and Hong, C.B.** (2009). Heat-inducible C3HC4 type RING zinc finger protein gene from *Capsicum annuum* enhances growth of transgenic tobacco. *Planta* **229**, 861-871.
- Zhang, H., Zhang, D., Chen, J., Yang, Y., Huang, Z., Huang, D., Wang, X.C., and Huang, R.** (2004). Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Mol Biol* **55**, 825-834.
- Zhang S.Z., Yang B.P., Feng C.L., and Tang H.L.** (2005). Genetic Transformation of Tobacco with the Trehalose Synthase Gene from *Grifola frondosa* Fr. Enhances the Resistance to Drought and Salt in Tobacco. *Journal of Integrative Plant Biology*. **5**.
- Zhou, J., Zhang, H., Yang, Y., Zhang, Z., Hu, X., Chen, J., Wang, X.C., and Huang, R.** (2008). Abscisic acid regulates TSRF1-mediated resistance to *Ralstonia solanacearum* by modifying the expression of GCC box-containing genes in tobacco. *J Exp Bot* **59**, 645-652.
- Zhu, J.K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 247-273.

表一、VIGS 靜默番茄特定基因並檢測接種青枯菌後之菌量

Silenced Gene	Sample No.	Mean ^a			
		Collar		Stem	
<i>AtNPR1</i>-array					
WRKY DNA-binding protein 53 (WRKY53)	36	3.59	ns ^b	1.36	ns
zinc finger protein-like (<i>SIZFP</i>)	36	4.59	** ^b	3.64	**
polygalacturonase inhibitor protein (<i>PGIP</i>)	36	4.53	* ^b	2.29	**
pathogenesis-related protein (STH2)	36	2.6	ns	0.83	ns
oxophytodienoate reductase 3 (OPR3)	36	1.6	ns	0.91	ns
MAP kinase16 (MAPK16)	33	2.69	ns	1.16	ns
methylenetetrahydrofolate reductase (MTR)	24	4.0		2.28	
nucleic acid binding protein (<i>NABP</i>)	12	6.9	- ^d	4.1	-
calmodulin-7	12	4.07		1.42	
control (TRV-infected ^c)	98	2.73		0.47	
<i>AtCBF1</i>-array					
RAV2	35	5.24	**	3.8	**
ERF5	36	3.7	ns	2.26	ns
control (TRV-infected ^c)	48	3.6		0.99	

^a 青枯病菌平均菌量(log [CFU/gram plant tissue])。

^b **: highly significant; *: significant; ns: not significant.

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

^d 樣本數不足未採取統計。

表二、檢測 VIGS 靜默效率所使用之引子

Genes	Accession Number	Gene-Specific primers	Fragment length (bp)
<i>SIZFP</i>	TC122455	F: 5'-AACGGTATGAACCGTGAAGC-3' R: 5'-GGGCAGAGCGGTACTAACAG-3'	255
<i>WRKY53</i>	TC116257	F: 5'-AATGGGCTTGAAGGTCCATG-3' R: 5'-GGTTTGGTGTTCAGAGTTG-3'	307
<i>MAPK16</i>	TC117792	F: 5'-CTTCTTCCATGGATCCTACC-3' R: 5'-ATCTGGATGCCTAAGTAGCC-3'	251
<i>MTR</i>	TC116781	F: 5'-GTGATATAACATGGGGTGCTG-3' R: 5'-CAGGATGTGCCTCTGGATAAC-3'	330
<i>Calmodulin-7</i>	TC123982	F: 5'-GGGACTGTGATGAGGTCGTT-3' R: 5'-GCAGCAGAGATGAACCCATT-3'	212
<i>NABP</i>	TC118151	F: 5'-GGTGGTGGAGCTATGGCTAA-3' R: 5'-AAACGAGTCGGCCTAACAGA-3'	292
<i>RAV2</i>	AK320001	F: 5'-GTTACACCAAGTGACGTTGG-3' R: 5'-CAATATCACCGGCCTTCAAG-3'	238
<i>ERF5</i>	AY559315	F: 5'-GAGAAGAAGCATTACAGGGG-3' R: 5'-CATCCCAAATCGTCGACCAA-3'	376
<i>Ubi3</i>	X58253	F: 5'-TGCAGATCTTCGTGAAAACC-3' R: 5'-AGCGAGCTTAACCTTCTTCT-3'	302

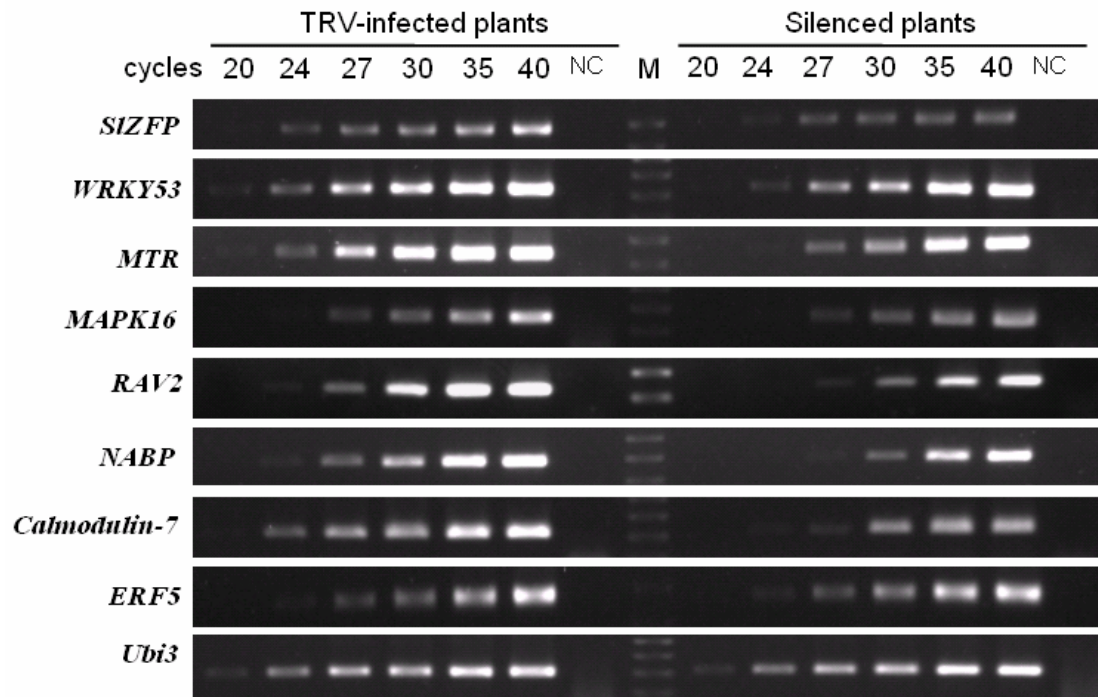
表三、用來設計 VIGS 片段所使用之引子

Targeted tomato genes	Accession Number	Gene-Specific primers	Fragment length (bp)
<i>SIZFP</i>	TC122455	F: 5'-GGAGTGCATAAAGCAGTGGT-3' R: 5'-ACAAAGCCAGAAGAAGGCCT-3'	307
<i>WRKY53</i>	TC116257	F: 5'-CACTTGCTCTCTCCTACTTC-3' R: 5'-CACCTTCAAGAAGAAGAGCC-3'	325
<i>MAPK16</i>	TC117792	F: 5'-AGATGGAAGCATCTGCCAGT-3' R: 5'-GGGTATCTGTAGAATTGTGGG-3'	302
<i>MTR</i>	TC116781	F: 5'-TGGAGTTCTTCTGCTCTCAG-3' R: 5'-CATTATCGACGAGGCTGACC-3'	333
<i>Calmodulin-7</i>	TC123982	F: 5'-GAAGTGGATGCTGATGGTAA-3' R: 5'-CACTTGGCCATCATGACCTT-3'	287
<i>NABP</i>	TC118151	F: 5'-AACCATAGACCTCGCAAAG-3' R: 5'-TCTCAGGATATTCAATCTGG-3'	314
<i>RAV2</i>	AK320001	F: 5'-GTGAGTTTTCAACGATCTAC-3' R: 5'-CCCTTTGTTTCTTCTACATG-3'	301
<i>ERF5</i>	AY559315	F: 5'-GGGTTCTCCACAAGAGACTT-3' R: 5'-CCCCTGTAATGCTTCTTCTC-3'	318
<i>OPR3</i>	TC124656	F: 5'-TGGCGTCTTCAGCTCAAGAT-3' R: 5'-CCATGAGTTCCATCAGGCAT-3'	439
<i>PGIP</i>	TC116878	F: 5'-AGACTTAGGCAATCCTTACC-3' R: 5'-ACCTGTAAGGTTAGTGAAGC-3'	280
<i>STH2</i>	TC124012	F: 5'-GGAAAGCCATTGACCTATTC-3' R: 5'-TGGAAGGAACAAAACACACA-3'	274
<i>PDS</i>	CAA42573	F: 5'-CTGACGAACCTTCAATGCAGT-3' R: 5'-ATATATGTACATTTATCACAGGTAC-3'	372

表四、Real-time PCR 及 *SIZFP* 選殖所使用之引子

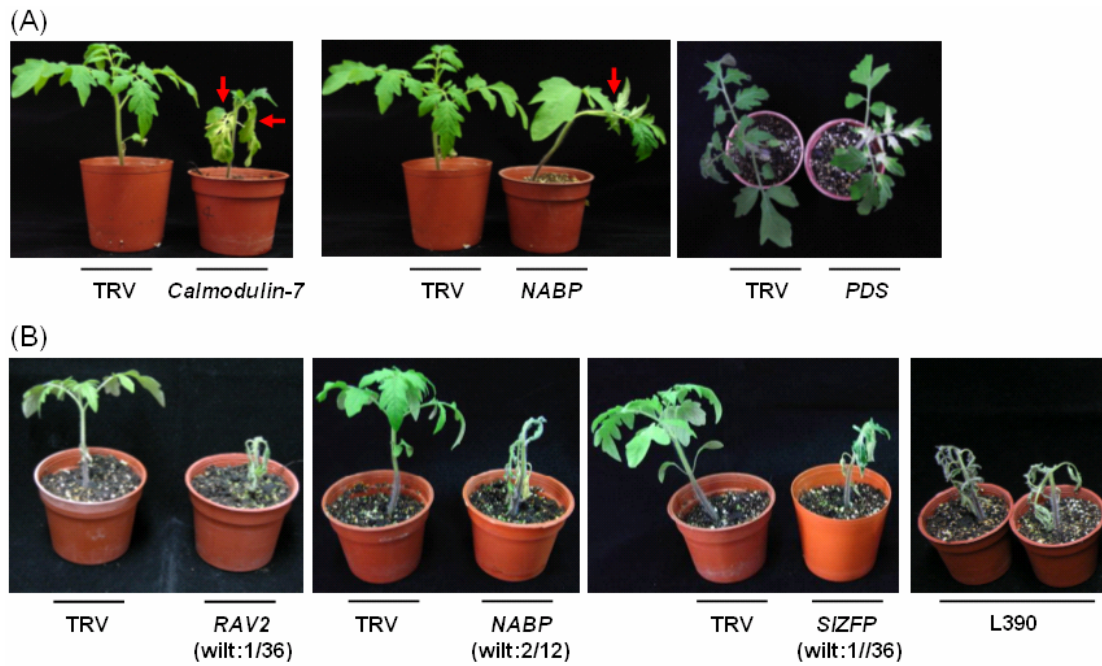
Genes ^a	Accession Number	Gene-Specific primers	Fragment length (bp)
<i>AAA-type ATPase</i>	TC162402	F: 5'-AAAGTTCCGCCTCTCAATCA-3' R: 5'-ATCATTAGCCGAGCTGTTGC-3'	206
<i>CCS</i>	TC154917	F: 5'-TTTTTGGTGTGTTTCGCTTG-3' R: 5'-ATGCCTCTCCTTTCTCGTCA-3'	204
<i>SICLL</i>	TC162132	F: 5'-GCCTAATCTCGGTTGCTCTGA-3' R: 5'-CCTATGGCCCTGGAAGAATTT-3'	210
<i>Expressed protein</i>	- ^e	F: 5'-TGTCGACAGATGTGCATTGTAA-3' R: 5'-ATTAGCCAAATGGGGTGTCA-3'	242
<i>SIRLI2</i>	TC155448	F: 5'-TCTGACGAGGTTGACGCTCTGA-3' R: 5'-CATCAACCCAATCAAGCACCT-3'	201
<i>snRNP</i>	TC157998	F: 5'-AGCCAGTCGTTCACTGACCT-3' R: 5'-TTCGCAAGCCAATATCAGAA-3'	214
<i>RAV2</i>	AK320001	F: 5'-GTTACACCAAGTGACGTTGG-3' R: 5'-CAATATCACCGGCCTTCAAG-3'	238
<i>SIZFP</i>	TC122455	F: 5'-AACGGTATGAACCGTGAAGC-3' R: 5'-GGGCAGAGCGGTACTAACAG-3'	255
<i>Pti4</i>	U317071	F: 5'-GGATCAACAGTTACCACCGACG-3' R: 5'-ACCATCCGACGCTTAGAGCG-3'	182
<i>WIPI-2</i>	K03291	F: 5'-GACAAGGTACTAGTAATCAATTATCC-3' R: 5'-GGGCATATCCCGAACCCAAGA-3'	151
<i>ERF5</i>	AY559315	F: 5'-GAGAAGAAGCATTACAGGGG-3' R: 5'-CATCCCAAATCGTCGACCAA-3'	376
<i>EF1</i>	X14449	F: 5'-GATTGGTGGTATTGGAAGTGTG-3' R: 5'-AGCTTCGTGGTGCATCTC-3'	130
Genes ^b	Accession Number	Primer Sequences	
<i>SIZFP</i>	TC122455	F: 5'-ATGGATGAATATCCTGTAAAAGAGCTGGG-3' R: 5'-AGATGTCGGTTTCGATGATTCTACTG-3' ^c R: 5'-CTAAGATGTCGGTTTCGATGATTCTACTG-3' ^d	

^a 用於 Real-time PCR 之引子；^b 用於基因選殖之引子；^c 不含停止密碼子；^d 包含停止密碼子；^e no paralogue was identified in databases



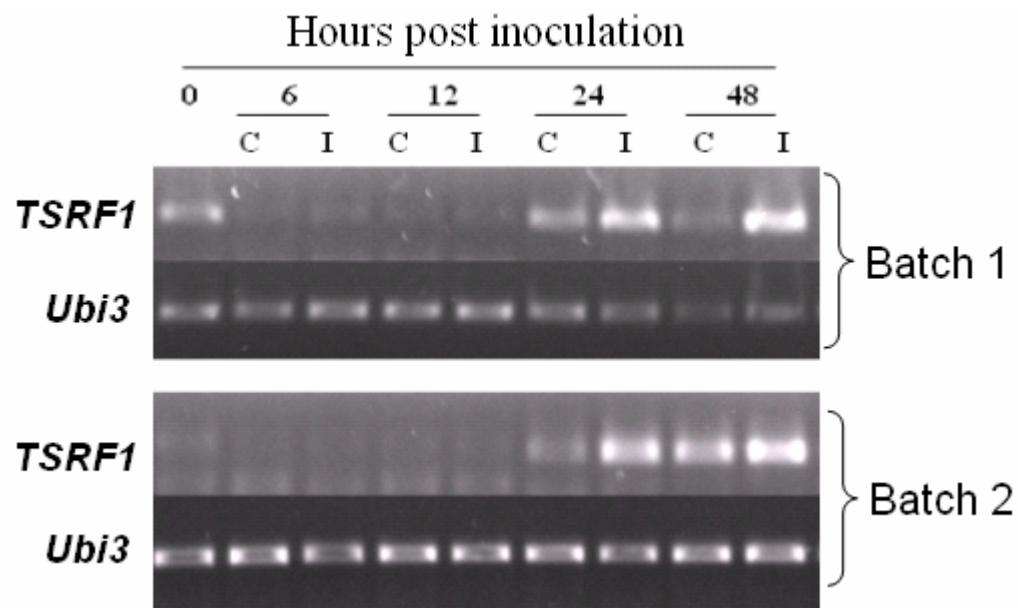
圖一、以半定量 RT-PCR 檢測 VIGS 靜默特定基因效率之測定。

農桿菌攜帶 pTRV1 以及 pTRV2-targeted genes (silenced) 或者 empty pTRV2 vector (TRV-infected) 注射到番茄後第 15 天，抽取番茄莖基部 RNA 以半定量 RT-PCR 分析特定基因靜默之效率。已重複兩批不同實驗且得到一致結果。*Ubi3* 為 RNA 定量的控制組。NC: negative control 為反轉錄前的 RNA 進行 PCR 以驗證沒有 DNA 污染。M: DNA ladder。



圖二、利用 VIGS 靜默番茄特定之基因使番茄出現生長受阻或。

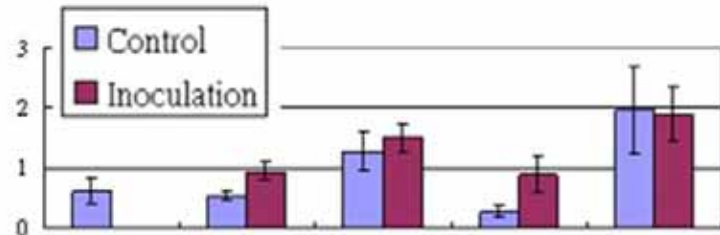
番茄注射帶有 pTRV1 及 pTRV2-*RAV2*、pTRV2-*Nucleic acid binding protein*、pTRV2-*SIZFP*、pTRV2-*Calmodulin-7* 或者 pTRV2 empty vector 的農桿菌後十天，(A)一些基因靜默會使得番茄出現生長受阻的性狀，紅色箭頭標示外表形變異的部位，*PDS* 靜默後番茄葉部白化做 VIGS 效率的對照組。(B)接種青枯病菌後五天，一些番茄出現萎凋的外表型，L390 萎凋做為青枯病菌接種的對照組。



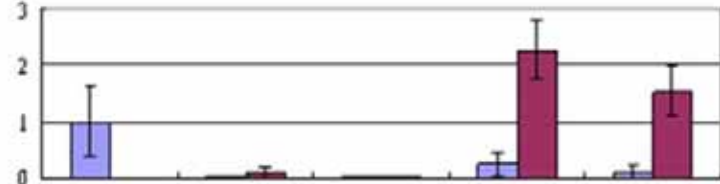
圖三、半定量 RT-PCR 檢測番茄接種青枯病菌之標示基因。

抗病品系番茄 H7996 澆灌青枯病菌菌液或去離子水後，收取各個時間點之番茄莖基部樣本，抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，以半定量 RT-PCR 檢測 *Tsrf1* 的表現量。C: 澆灌水之控制組；I: 澆灌青枯病菌菌液。

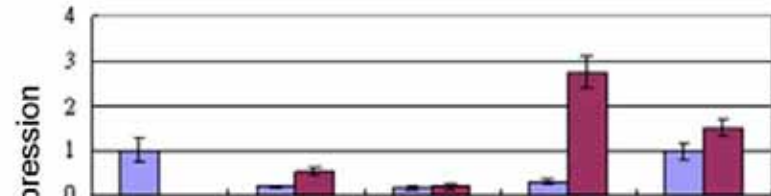
(A) *SIZFP*



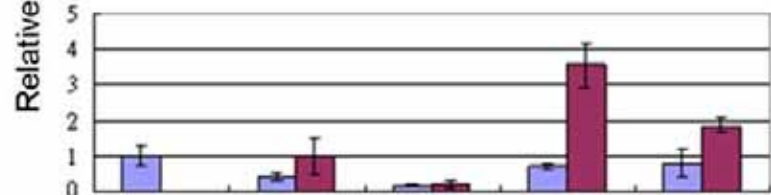
(B) *SICLL*



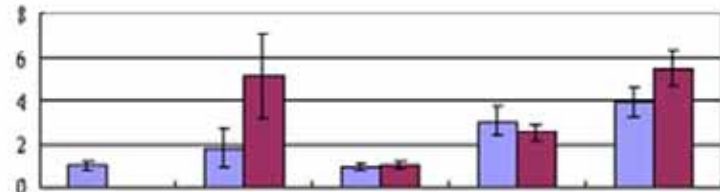
(C) *RAV2*



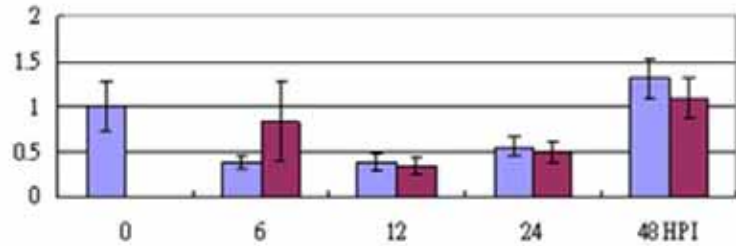
(D) *expressed protein*

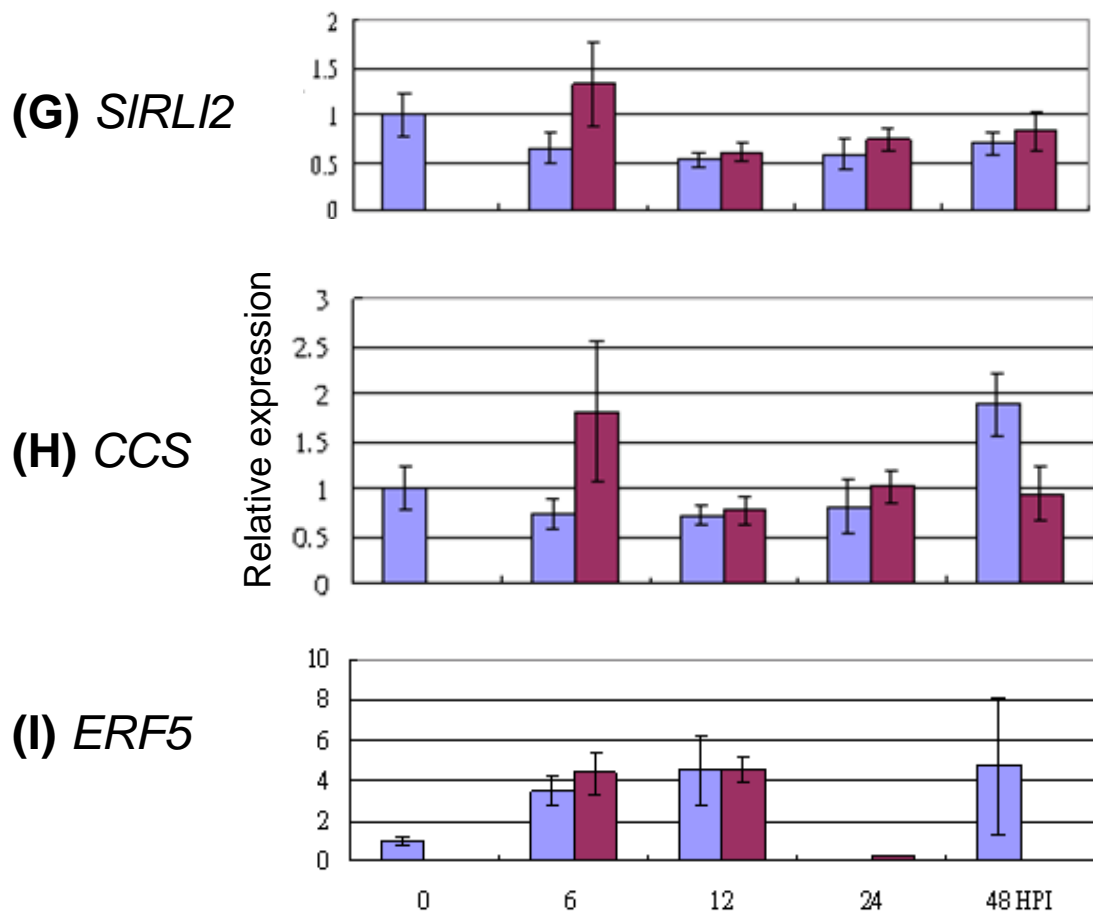


(E) *AAA-type ATPase*



(F) *snRNP*





圖四、Real-time PCR 檢測番茄接種青枯病菌後一群基因的表現分析。

三週大抗病品系番茄 H7996 澆灌青枯病菌菌液或去離子水後，收取各個時間點之番茄莖基部樣本，抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，以 Real-time PCR 檢測(A) *SIZFP*、(B) *SlCLL*、(C) *RAV2*、(D) *Expressed protein*、(E) *AAA-type ATPase*、(F) *snRNP*、(G) *SIRLI2*、(H) *CCS*、(I) *ERF5* 的表現量。C: 澆灌水之控制組；I: 澆灌青枯病菌菌液；HPI: hours post inoculation。

```

SI ZFP      1  MDEYPVKRRAGNGLVAARRG - - - LRDTAENKDKN - - VQYCSRLGCSGRVNYTKSTRVG - - 52
#5G24870   1  MDGFKGKR - TSRP IMPRKASGLV LHENMKKKDOKSVVPICSRIGCSSRVSSTKGDLI - - 56
#5G10650   1  MDGCAGKRSVDRLVVPRKASGLTLRENMNKTDGK - NVVPCSRVGC TAKVTS TKRSRIRGST 59
#4G31450   1  MDRWSSSKRAMEARPDSKKKGGVFRDRFNNSNSCK - - MPICSS - - - DEKKS MNFTRFVGS S 54

SI ZFP      53  GMEKPRPLRPTFGSSNGKEVVGSSSVTSSGTTARRSGKES - HKKYSSNIEDKRS DTS S L 111
#5G24870   57  DHKAKATVSSFRSP LSGKETVGSRSMSGFGGTTKASKVIORRQLSS LLOMDSSESSV 116
#5G10650   60  DNNTKVG LPPVPS TLNRKEVGSRSRTPGGFGYLRKPAKVTARRQPS SLDTESSETSCI 119
#4G31450   55  DKKEKSVLSTYRSSP NGKEVGTSSKICISSSSSVKS - - - GEKQPFSSQIAIDSSSSRS 110

SI ZFP      112  RKES - QVLKQMSSSTERQFQFDSAKRDTGSSKVVFTVEVGCSSGTSNSRPFKIFGHGPGSS 170
#5G24870   117  NEDSPTSERSLPRGKTKESTISVHSESSVSGEVVT - EAGSSSRGTGRS IHQRPDLVSRDA 175
#5G10650   120  HDDPAATEPTLPRQKT KRYTINVHPQSAVSRVVITKAGSSSRGTSRI SHPKSELGTRDA 179
#4G31450   111  EDEVESEILOVPLGRDKRRMNKLIYGVKITPEAEC SKLPS SRIKGRFRORFGLSKQEF 170

SI ZFP      171  NQKSPMNSSISSSSKSSISAGTRSSSSGEGYRLRN LKCNSTFDVLPYSSSSSESSISRRET 230
#5G24870   176  RVS - - - - - NSEQNARASVKNK - - - - NGLRDLRNKSGSDVLPSSNSTPTR - - - KSN I 217
#5G10650   180  LTGPSVSTSSGNS EHTVRGGLSR - - - - HRLRNLS CNSVSDVLP TNSSAT - - - KISV 229
#4G31450   171  HPGP - - - - - SGQSTS ANRGCS P - - - - - LLSGVTPSGFGLDKRLSRKADT 209

SI ZFP      231  VKRRNTEGESSSSSKGK - KMSGAS PNEGRAVRP - ATGISISDSRSSRSSDFSDGNRAVSV 288
#5G24870   218  FRKKTSDGESSSSSGRN - KTEGSSVVGKNISSPOGNGITMSEPRRNRLNLPVSRDMSVVS 276
#5G10650   230  TSKKNADGESSLSKGS - KTSVLVPKVRNQISSHGNGVTVSDNRRNRVVP SIRDSTMV S 288
#4G31450   210  ISKTKVYGEDSSSSSARGKNVTEPPVEVRRSSFNPRGSSVDSRRARHC ILODDNDVASV 269

SI ZFP      289  RTRFSMNVSTRLRGPVQDSLHTKSSGLSQNLPEHGTPNLDMPSSSSQLFMDSSSSDYSTY 348
#5G24870   277  STRR - - - - - STGYGRTRGAGAVAT - - - - LQAPRPPTRADLNPSSA - - - - EASRSP LNSY 324
#5G10650   289  NGCR - - - - - RAGYFRGRSERLGATASSATSROMPHPTTPTDNP S - - - - - LSF C P SNIY 336
#4G31450   270  GSDRLANRRNSRIRGSGRDLSSVTAEMSQTETSNNLN - - - - - 308

SI ZFP      349  SLPANDYDDDDDEDEDDEDDLPQVVPFTSAEICINGMNRREALQRYNMDGVAQVLLALERIE 408
#5G24870   325  SRPI - - - - - SNGRLRS LMMFGSP - - - SEAGLSRSLMNRDTFRRYNMNGVAEVLLALERIE 377
#5G10650   337  S - - - - - - - - - - STGRVHS - NMPGSP - - - TEADPSSSLVNRDGLSHYNMNGIAEVLLALERIE 384
#4G31450   308  - - - - - - - - - - SPVSLLELFGFR - - - EFGLSGSLLSHDSFRSYNLDGISEITLPELDRIE 353

SI ZFP      409  QDEELTYERLLALESNLFLSGLN - FYDQHRDMRLDIDNMSYEELLAL EERIGSVSTALPE 467
#5G24870   378  QDEELTYEQ LAVLETNLF L N G M S S F H D Q H R D M R L D I D N M S Y E E L L A L E E K M G T V S T A L S E 437
#5G10650   385  HDEELTYEQ LASIETNLF S G M F R F Y D Q H R D M R L D I D N M S Y E E L L A L G D K M G T V S T A L S E 444
#4G31450   354  QDTELNYEDLLIMETGLLGLLS - FHDQHRDMRLDIDNMSYEELLAL EERIGTVSTALTE 412

SI ZFP      468  EELLKCLRNNIYQGMAS ETE TLEAEDG - - - DDIKCSICQEEYVIGDEIGNLGC EHG YHME 525
#5G24870   438  EALLKSLKSSIYR - PNDESODI CLNKD - - - DDV KCSICQEEYVGGDEVGTLP CQH KYHVS 493
#5G10650   446  EALSRS LKQSIYQ - ETD E T G S I S L Y K D - - - DD I K C S I C Q E E Y V G D E L G T I P C Q H M Y H V S 500
#4G31450   413  EALS KCLKTSIYQMKPLSYGSI T K S P S D N K E D A K C S I C Q E E Y T I G D E V G R L H C E H T Y H V K 472

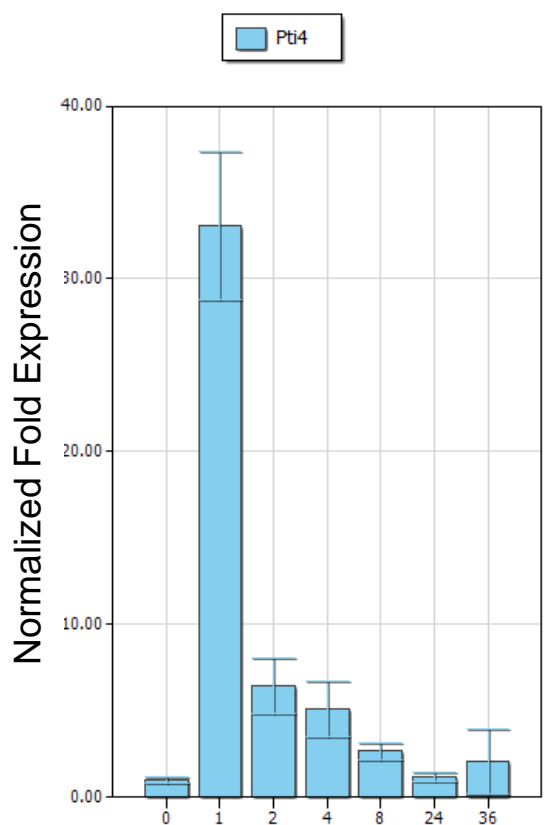
SI ZFP      526  C I K Q W F K L K N W C P I C K A A V E S S K P T S - 551
#5G24870   494  CAQQWLRMKNWCPICKTSAESQPHFSS 520
#5G10650   501  CVQQWLRMKNWCPICKTSAEEKSI - 525
#4G31450   473  CVQEWLRIKSWCPICKATAETS S K - - - 496

```

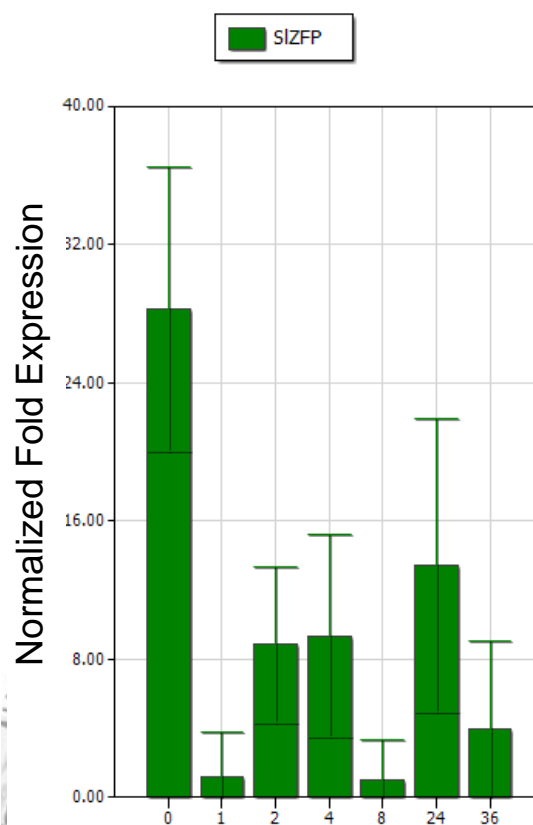


圖五、SIZFP 與阿拉伯芥中相似的蛋白質胺基酸序列比對。
 胺基酸序列比對使用的軟體為” Clustal W program of bioedit software (Tom Hall, USA)” ，蛋白質保守序列之預測是使用 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/search/Software/Pfam/search.shtml>) ，紅線所標示為網站預測到的 C3HC4-RING domain。

(A)



(B)

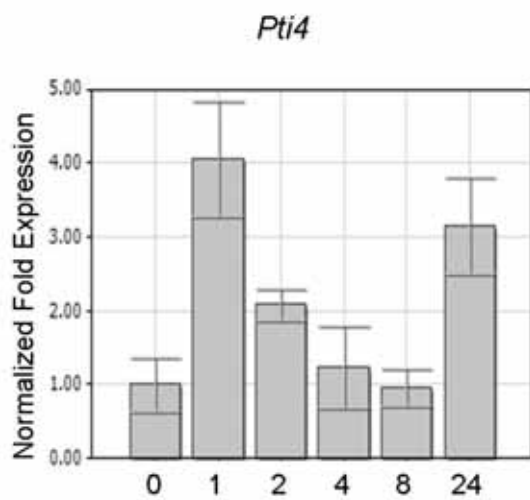


Time [h] after treatment

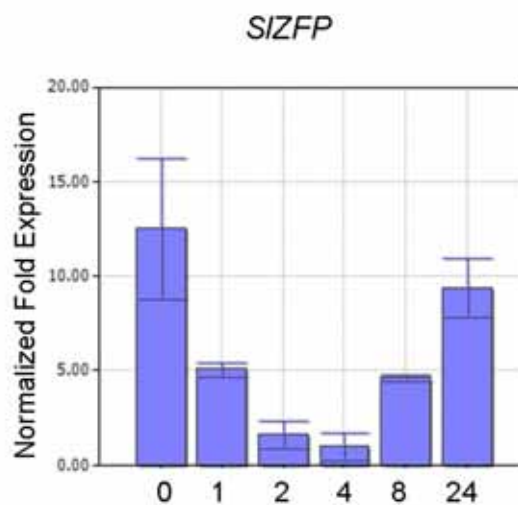
圖六、Real-time PCR 檢測番茄處理水楊酸後 *Pti4* 以及 *SIZFP* 的表現情況。

番茄處理水楊酸後，每個時間點隨機收取兩棵植物的葉部組織，抽取 RNA 後反轉錄為 cDNA 進行檢測。Real-time PCR 的 internal control 為 elongation factor 1 a (*EF1a*)，各個時間點 *pti4* 或 *SIZFP* 的表現量以 *EF1a* 為基準，計算成相對表現量後進行比較。Y 軸表示基因的相對表現量，X 軸表示處理水楊酸後的各個時間點。

(A)



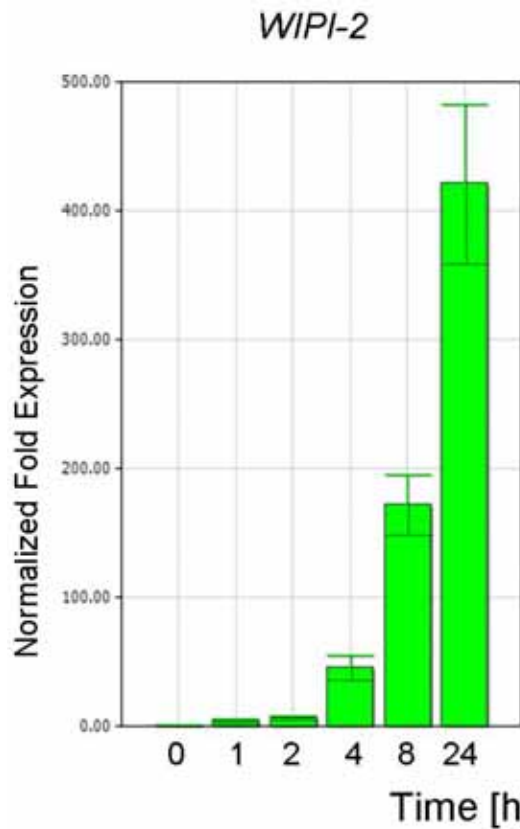
(B)



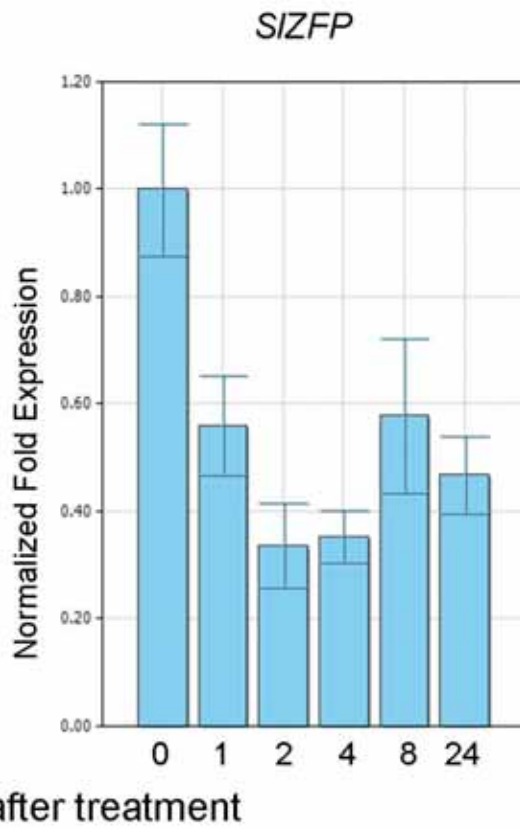
Time [h] after treatment

圖七、Real-time PCR 檢測番茄處理 ethephon 後 *Pti4* 以及 *SIZFP* 的表現情況。番茄處理 ethephon 後，每個時間點隨機收取兩棵植物的葉部組織，抽取 RNA 後反轉錄為 cDNA 進行檢測。Real-time PCR 的 internal control 為 elongation factor 1 (*EF1*)，各個時間點 *pti4* 或 *SIZFP* 的表現量以 *EF1* 為基準，計算成相對表現量後進行比較。Y 軸表示基因的相對表現量，X 軸表示處理 ethephon 後的各個時間點。

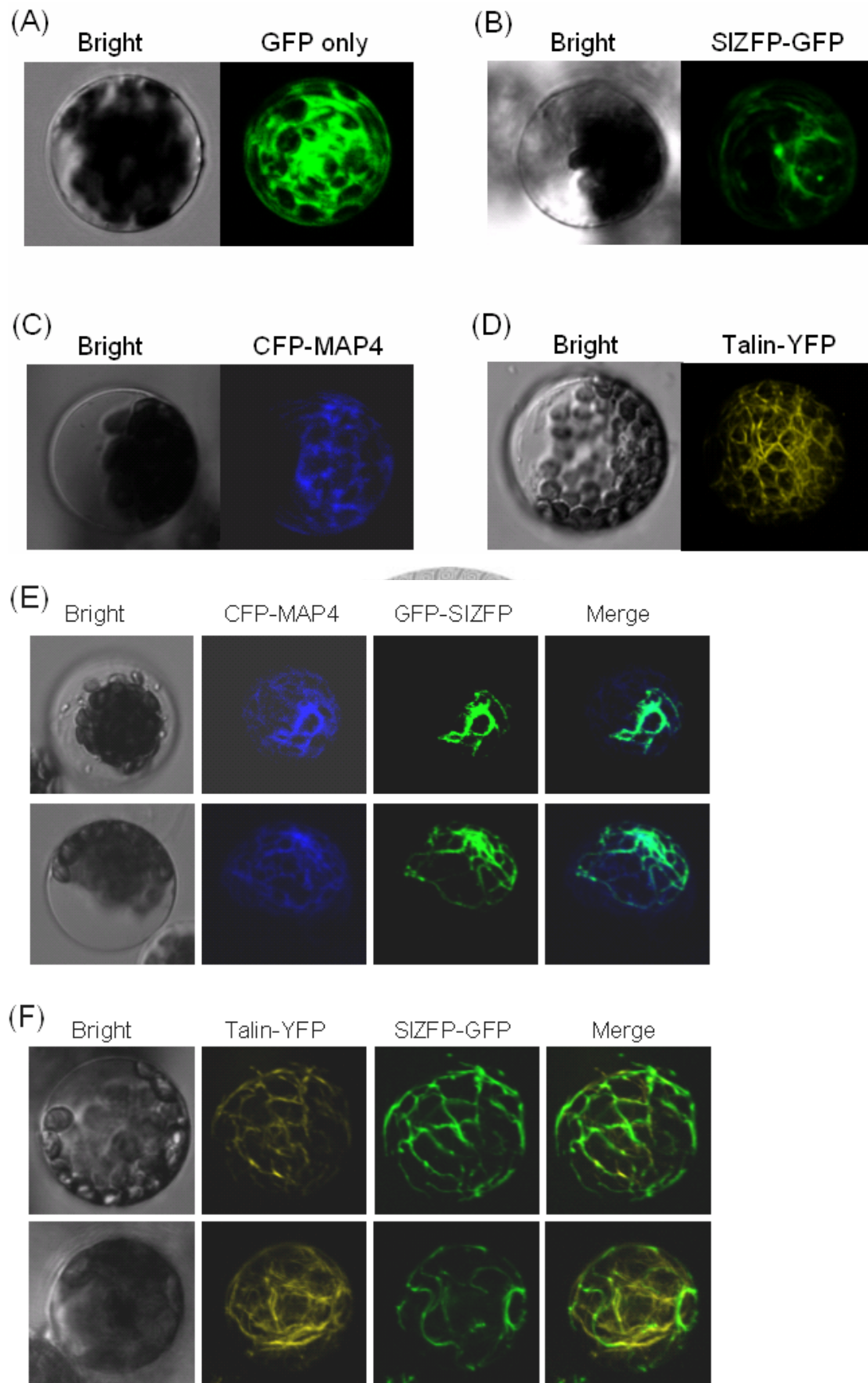
(A)



(B)



圖八、Real-time PCR 檢測番茄處理茉莉酸後 *WIPI-2* 以及 *SIZFP* 的表現情況。番茄處理茉莉酸後，每個時間點隨機收取兩棵植物的葉部組織，抽取 RNA 後反轉錄為 cDNA 進行檢測。Real-time PCR 的 internal control 為 elongation factor 1 (*EF1*)，各個時間點 *pti4* 或 *SIZFP* 的表現量以 *EF1* 為基準，計算成相對表現量後進行比較。Y 軸表示基因的相對表現量，X 軸表示處理茉莉酸後的各個時間點。



圖九、SIZFP 之綠色螢光重組蛋白在阿拉伯芥原生質體中的表現位置分析。

(A)單獨表現 GFP 在阿拉伯芥原生質體中。

(B)單獨表現 SIZFP-GFP 在阿拉伯芥原生質體中。

(C)單獨表現微管標示蛋白 CFP-MAP4 在阿拉伯芥原生質體中。

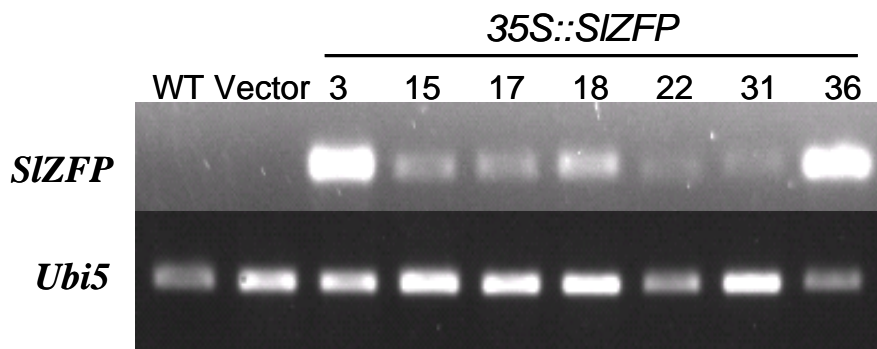
(D)單獨表現微絲標示蛋白 Talin-YFP 在阿拉伯芥原生質體中。

(E)同時表現 GFP-SIZFP 以及 CFP-MAP4 在阿拉伯芥原生質體中。

(F)同時表現 GFP-SIZFP 以及 Talin-YFP 在阿拉伯芥原生質體中。

以上圖片皆是 PEG 轉型作用處理後 18-22 個小時，利用共軛焦顯微鏡所拍攝。





圖十、利用 RT-PCR 檢測 35S::*SIZFP* 轉殖阿拉伯芥之 *SIZFP* 表現量。

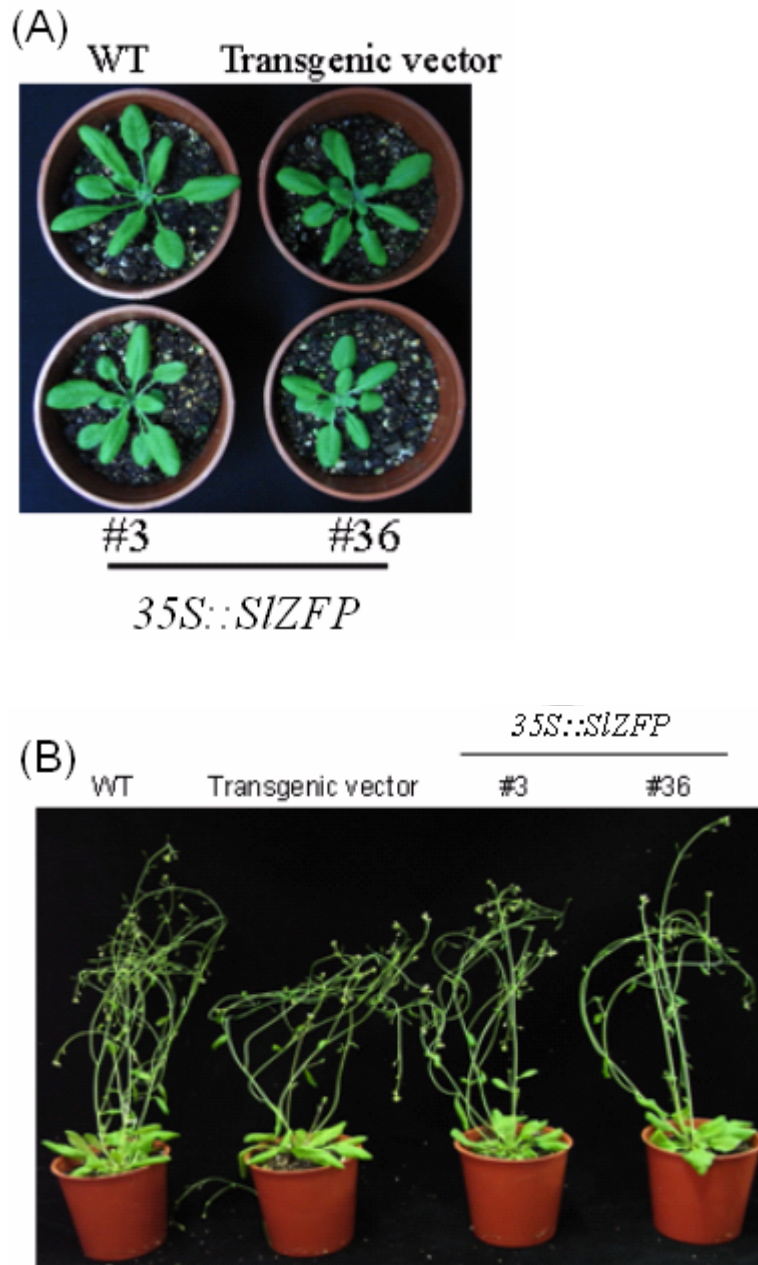
抽取 35S::*SIZFP* 轉殖株、野生型阿拉伯芥以及轉殖空載體的阿拉伯芥葉部

RNA，反轉錄後進行 PCR 檢測，PCR 條件為 25 cycle。WT 為野生株哥倫比亞

品系阿拉伯芥；Vector 為轉殖 pEarleyGate 201 empty vector 的阿拉伯芥轉殖株；

Ubi5 為 RNA 定量對照組。



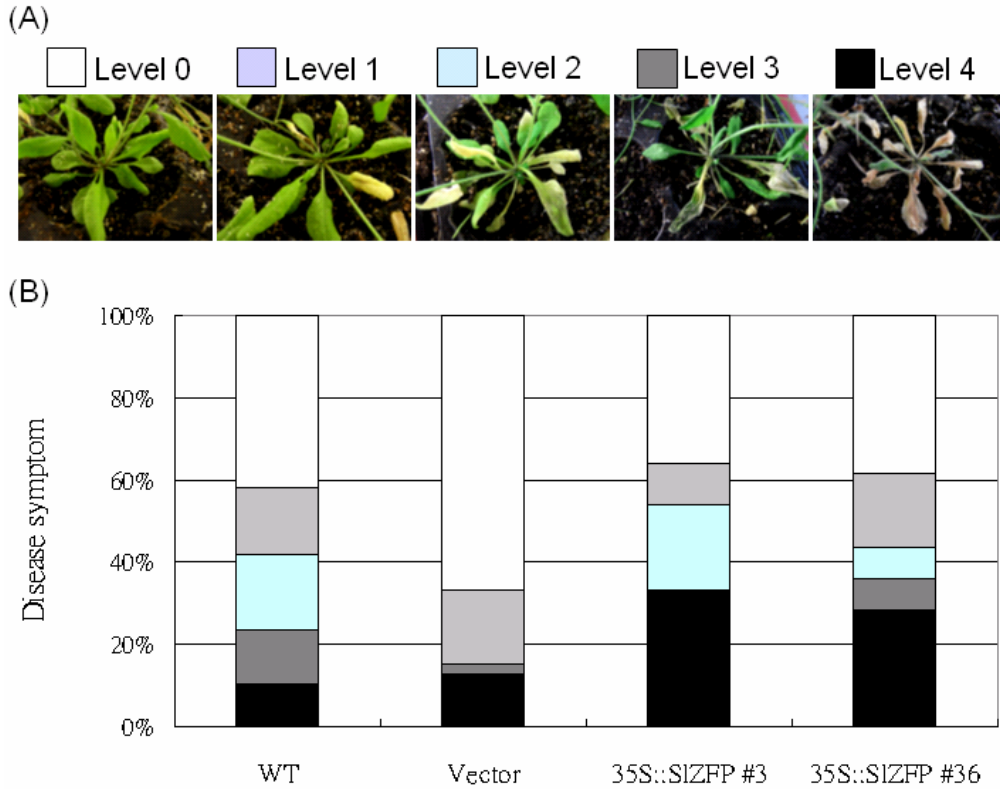


圖十一、*35S::SIZFP* 阿拉伯芥的外表型與野生株及轉殖空載體之阿拉伯芥比較無太大差異。

(A) 四周大阿拉伯芥植株。

(B) 七週大阿拉伯芥植株。

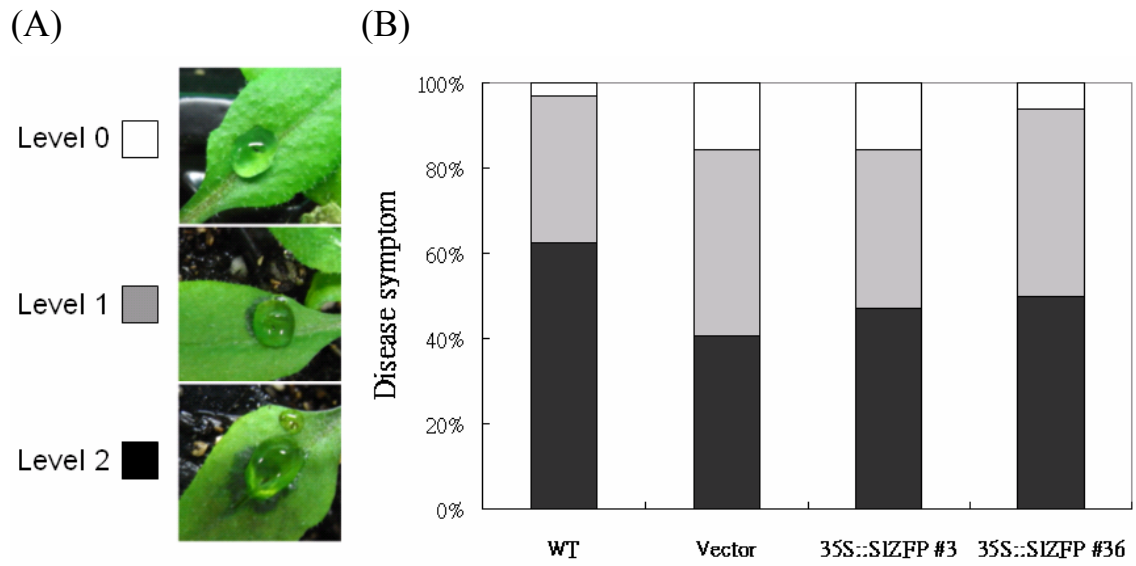
WT 為野生株哥倫比亞品系阿拉伯芥；transgenic vector 為轉殖 pEarleyGate 201 empty vector 的阿拉伯芥轉植株。



圖十二、三週大阿拉伯芥接種青枯病菌 RD15 進行抗病性測試。

(A)阿拉伯芥萎凋級數示意，Level 0：無明顯病徵；Level 1：25%的葉片萎凋；Level 2：50%的葉片萎凋；Level 3：75%的葉片萎凋；Level 4：葉片完全萎凋。

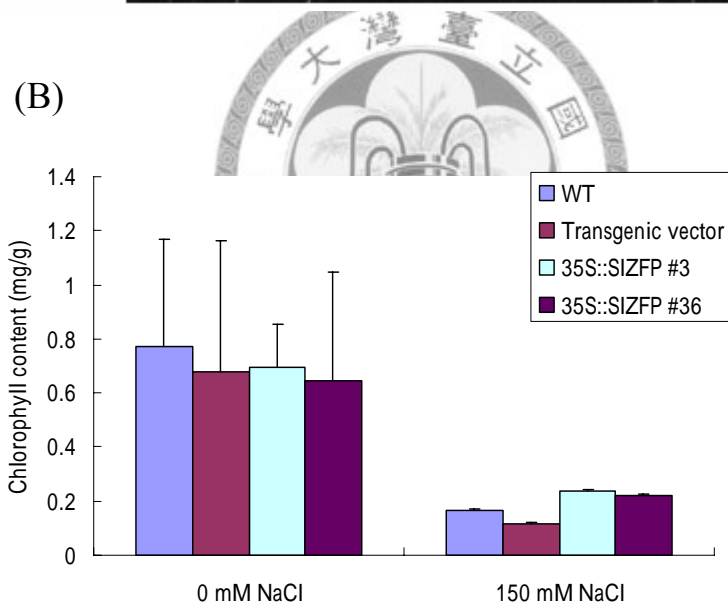
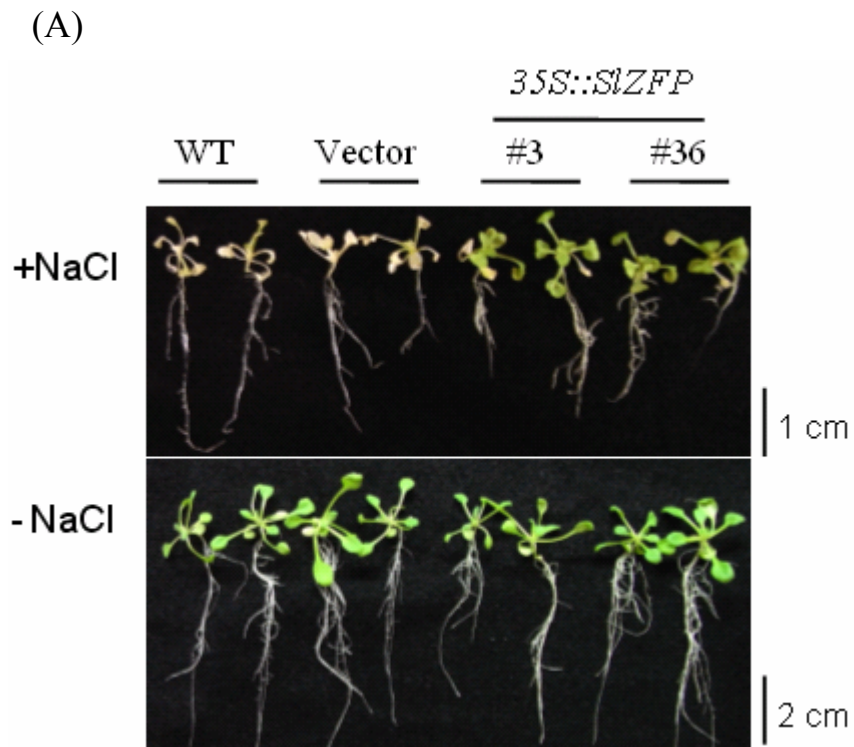
(B)35S::SIZFP 轉植株與對照組阿拉伯芥接種青枯病菌後第十二天計算植物萎凋級數，每次實驗每個 line 約二十棵植株進行抗病性測試，重複兩次後將萎凋級數合併計算分析。WT 為野生株哥倫比亞品系阿拉伯芥；Vector 為轉殖 pEarleyGate 201 empty vector 的阿拉伯芥轉植株。



圖十三、三週大阿拉伯芥接種軟腐病菌。

(A)阿拉伯芥軟腐病徵級數示意，Level 0：無明顯病徵；Level 1：接種部位有些微水浸狀病徵；Level 2：葉部出現明顯水浸狀病徵。

(B)接種軟腐病菌後第十天計算阿拉伯芥病徵級數，每次實驗每個 line 以 16 棵植株進行抗病性測試，重複兩次後將分數合併計算。

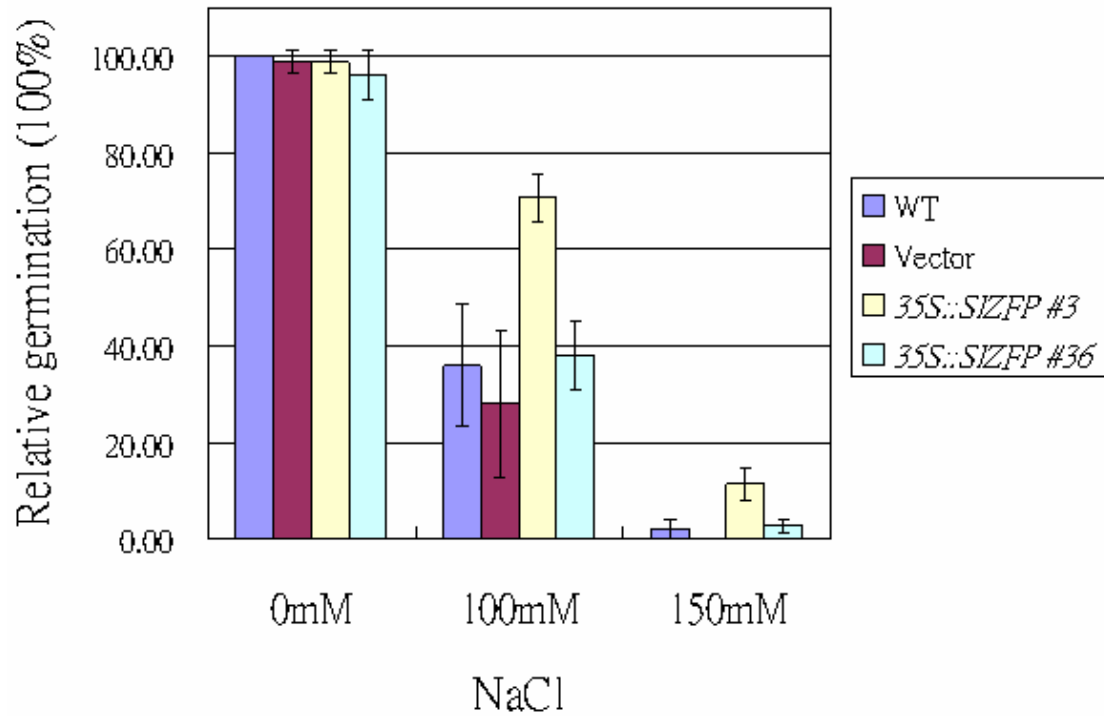


圖十四、過量表現 SIZFP 之阿拉伯芥擁有較高的鹽害耐受性。

(A)十天大的阿拉伯芥處理鹽害七天後拍照。

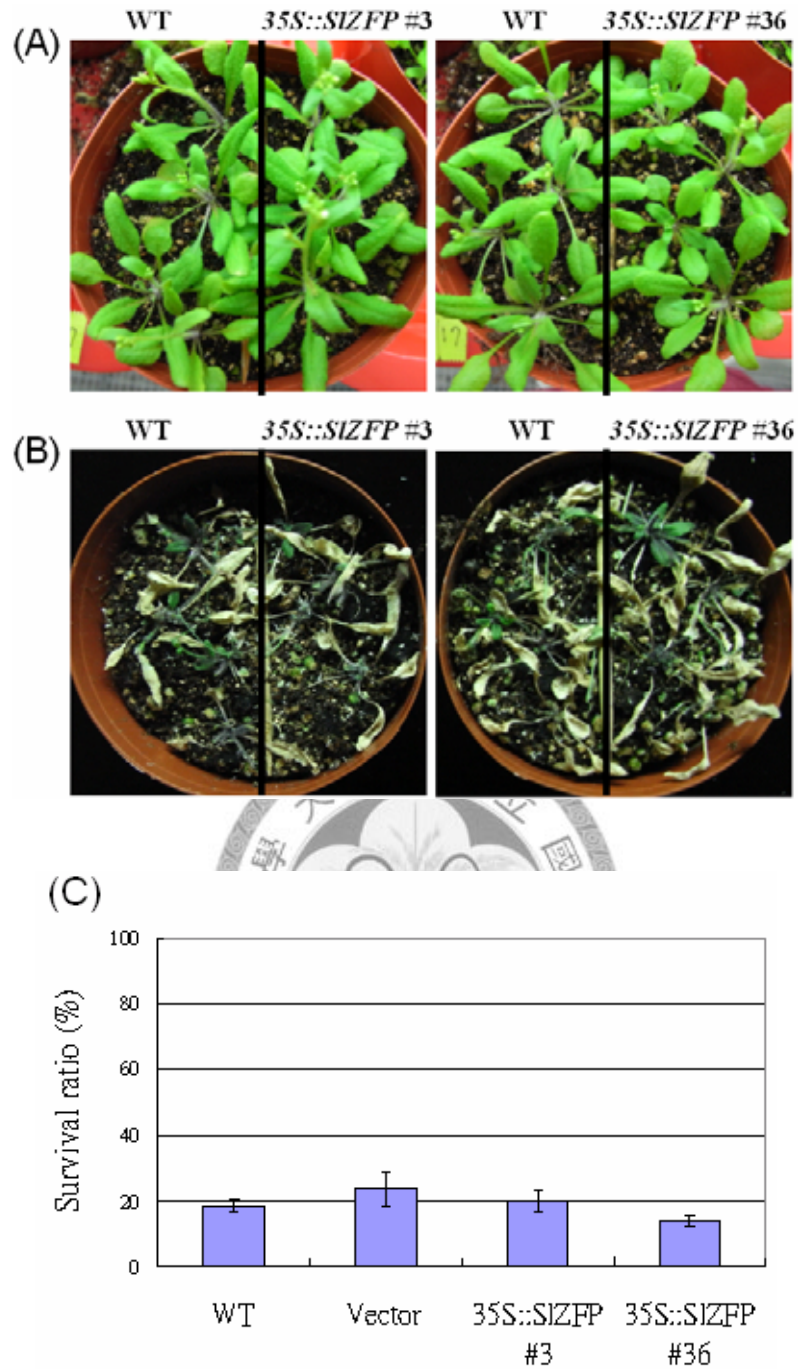
(B)阿拉伯芥處理鹽害與未處理鹽害之葉綠素定量。

WT 為野生株哥倫比亞品系阿拉伯芥；Vector 為轉殖 pEarleyGate 201 empty vector 的阿拉伯芥轉殖株。



圖十五、鹽害逆境下的阿拉伯芥種子萌發率。

種子消毒後播種於不處理鹽害或處理不同濃度鹽害逆境的 1/2 MS 固體培養基，每次實驗每個 line 為 50 棵種子，兩天後計算種子萌發的情況。本實驗已重複三次並將結果合併計算分析。WT 為野生株哥倫比亞品系阿拉伯芥；Vector 為轉殖 pEarleyGate 201 empty vector 的阿拉伯芥轉殖株。



圖十六、乾旱逆境測試顯示 *SIZFP* 不影響轉殖阿拉伯芥的耐旱性。

(A)三週大阿拉伯芥生長於土盆中的情形。

(B)斷水兩週後，再恢復澆水兩天後的生長情況。

(C)乾旱處理後恢復澆水兩天後計算阿拉伯芥存活數量。

WT 為野生株哥倫比亞品系阿拉伯芥；Vector 為轉殖 pEarleyGate 201 empty vector 的阿拉伯芥轉殖株。

附錄一、利用 VIGS 篩選 DNA 微陣列選出的可能防禦基因。(陳, 2008)

Silenced Genes	Plant no. ^a	Mean ^b			
		Stembase		Mid-Stem	
Fruit sucrose synthase (TOMSSF)	35	3.34	ns ^c	2.01	ns
MYB-related + membrane lipo protein	59	3.49	ns	2.07	ns
Zinc-finger protein	55	2.30	ns	0.88	ns
AAA-type ATPase	90	4.41	** ^c	2.04	**
eIF-2B family + unkown	59	3.92	**	1.59	**
Curculin-like lectin (<i>SICLL</i>)	47	4.10	**	3.27	**
TRAPP 33 kDa subunit	36	3.61	ns	1.54	ns
Small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)	36	3.87	* ^c	1.91	*
Copper/zinc superoxide dismutase copper chaperone precursor (<i>CCS</i>)	54	4.70	**	3.19	**
Alcohol dehydrogenase 2	36	3.71	ns	0.92	ns
RNase L inhibitor 2 (<i>SIRLI2</i>)	44	6.34	**	5.12	**
Expressed protein novel 1	37	3.92	*	2.25	*
novel 1	54	2.81	ns	1.92	ns
TRV-infected ^d	249	2.53		1.10	
L390 ^e	75	9.17		9.57	

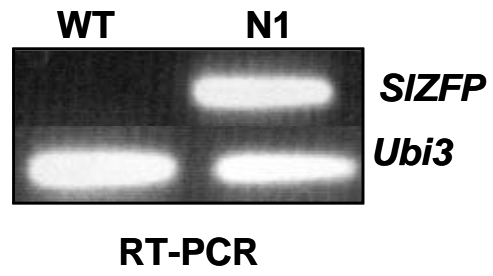
^a Total number of silenced H7996 plants collected from at least three independent experiments. Assessment was carried out 5 DPI by a method described in Materials and Methods.

^b Means of bacterial population (CFU/gram fresh tissue).

^c Pair-wise mean comparisons were made between TRV-infected and silenced plants with Student *t*-test method. **, highly significant; *, significant; ns, not significant.

^d *A. tumefaciens* inoculum containing pTRV1 plus pTRV2 empty vector is referred to as TRV-infected and used as the non-silenced control.

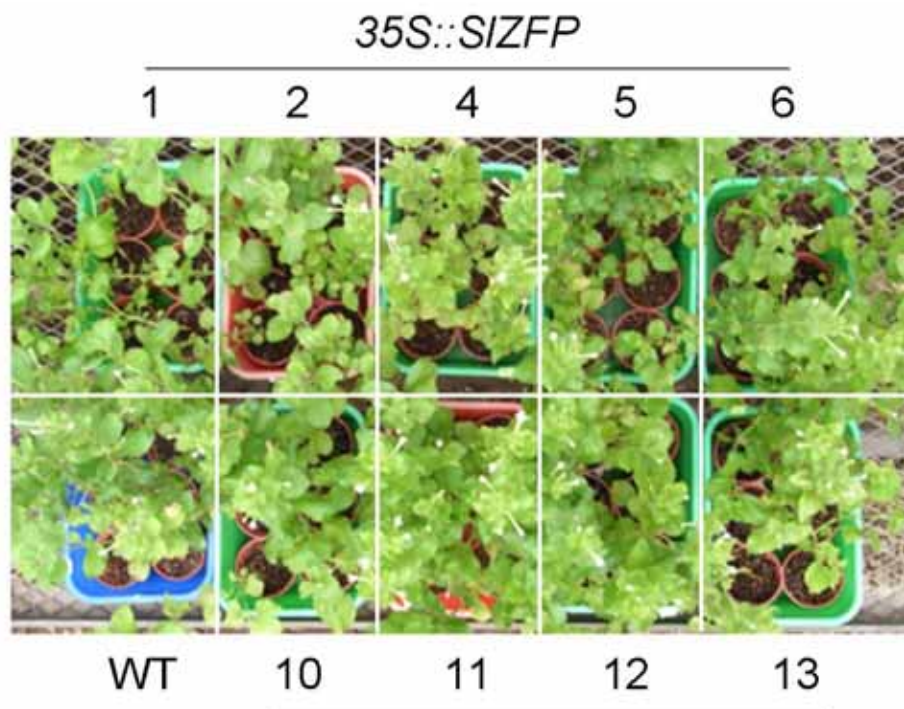
^e Tomato cultivar L390 was used as the susceptible control for *R. solanacearum* inoculation.



附錄二、反轉錄 PCR 檢測 *SIZFP* 在 *AtNPR1* 轉殖番茄中的表現情況。

WT 為野生型番茄，N1 為過量表現 *AtNPR1* 的轉殖番茄，*Ubi3* 為 RNA 定量對照組。(郭，2004)

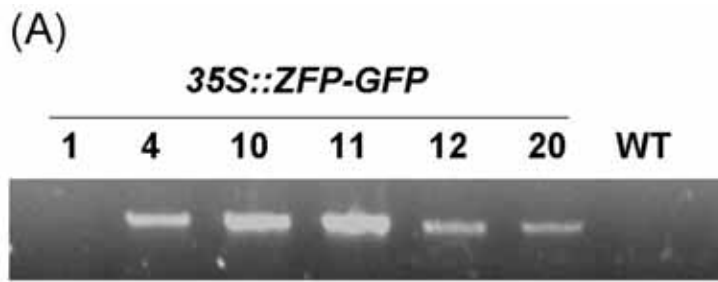




35S::SIZFP

附錄三、*35S::SIZFP* 轉殖菸草已培育到 R1 世代。





附錄四、35S::*ZFP-GFP* 轉殖菸草已經培育到 R1 世代。

(A) Genomic PCR 確認 R0 的 35S::*ZFP-GFP* 轉殖菸草帶有 *SIZFP*。

(B) 35S::*ZFP-GFP* 轉殖菸草 R1 世代在土盆中生長四到五周大的情形。

WT 為野生株菸草(*Nicotiana benthamiana*)。

附錄五、常用培養基及藥劑

(A) 培養基

523 medium

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

LB medium

Component	per Liter
Bacto tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Adjust pH to 7.0	
Additional 15 g agar for agar medium	

SM1 medium

Component	per Liter
Casein hydrolysate	10 g
Glucose Peptone	5 g
Agar	10 g
Autoclave	
5% TTC	1 mL
0.5% Chloramphenicol	1 mL
1% Cycloheximide	0.5 mL
1% Crystal violet	0.5 mL
5% Polymyxin B	2 mL
1% Tyrothricin	2 mL

SOC medium

Component	per Liter
Tryptone	20 g
Yeast extract	5 g
NaCl	0.5 g
250 mM KCl	10 mL
Add H ₂ O to 900 mL, adjust pH to 7.0, and add water to 990 mL	
Autoclave	
1 M MgCl ₂	10 mL
1 M Glucose	20 mL

YEP medium

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

(B) 藥劑

10xMOPS

Component	per Liter
Morpholinopropansulfonic acid	41.8 g
Sodium acetate	4.1 g
EDTA	3.7 g
Adjust pH to 7.0	
Autoclave	

RNA loading buffer

component	per Liter
50% formamide, deionized	125 μ L
37% formaldehyde	41.5 μ L
10x MOPS	25 μ L
80% glycerol	3 μ L
EtBr (10 mg/mL)	2 μ L

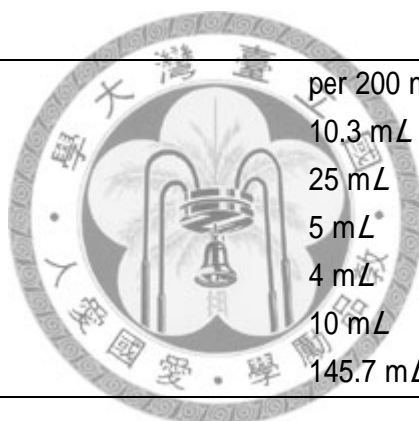
(C) 阿拉伯芥原生植體實驗

Enzyme solution

Component	per 10 mL
cellulase R10	0.15 g
macerozyme	0.03 g
0.8 M mannitol	5 mL
0.2 KCl	1 mL
0.1 M MES, pH 5.7	2 mL
water bath at 55	for 10 minutes
cool to room temperature	
1 M CaCl ₂	100 µL
10% BSA	100 µL
ddH ₂ O	1.2 mL

W5 solution

component	per 200 mL
3 M NaCl	10.3 mL
1 M CaCl ₂	25 mL
0.2 M KCl	5 mL
0.1 M MES, pH 5.7	4 mL
0.1 M glucose	10 mL
ddH ₂ O	145.7 mL

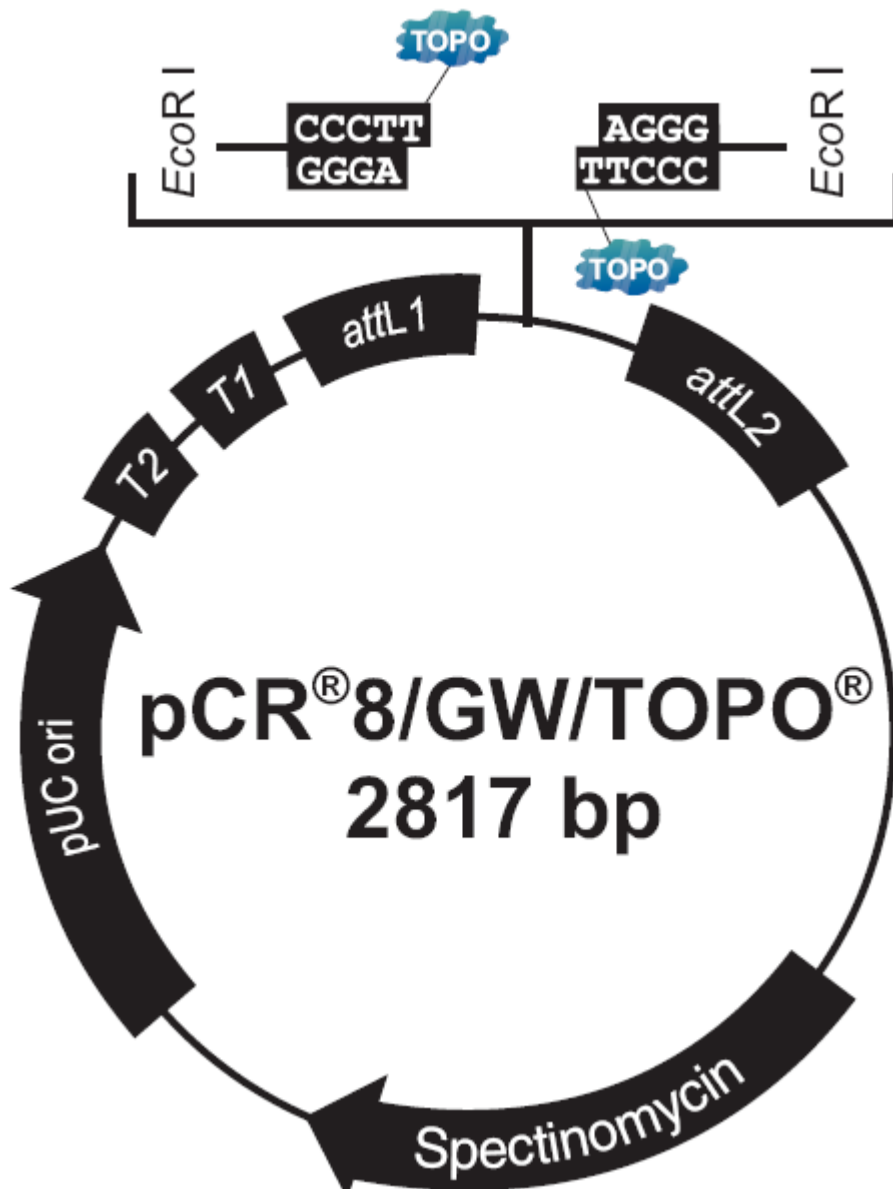


MMg solution

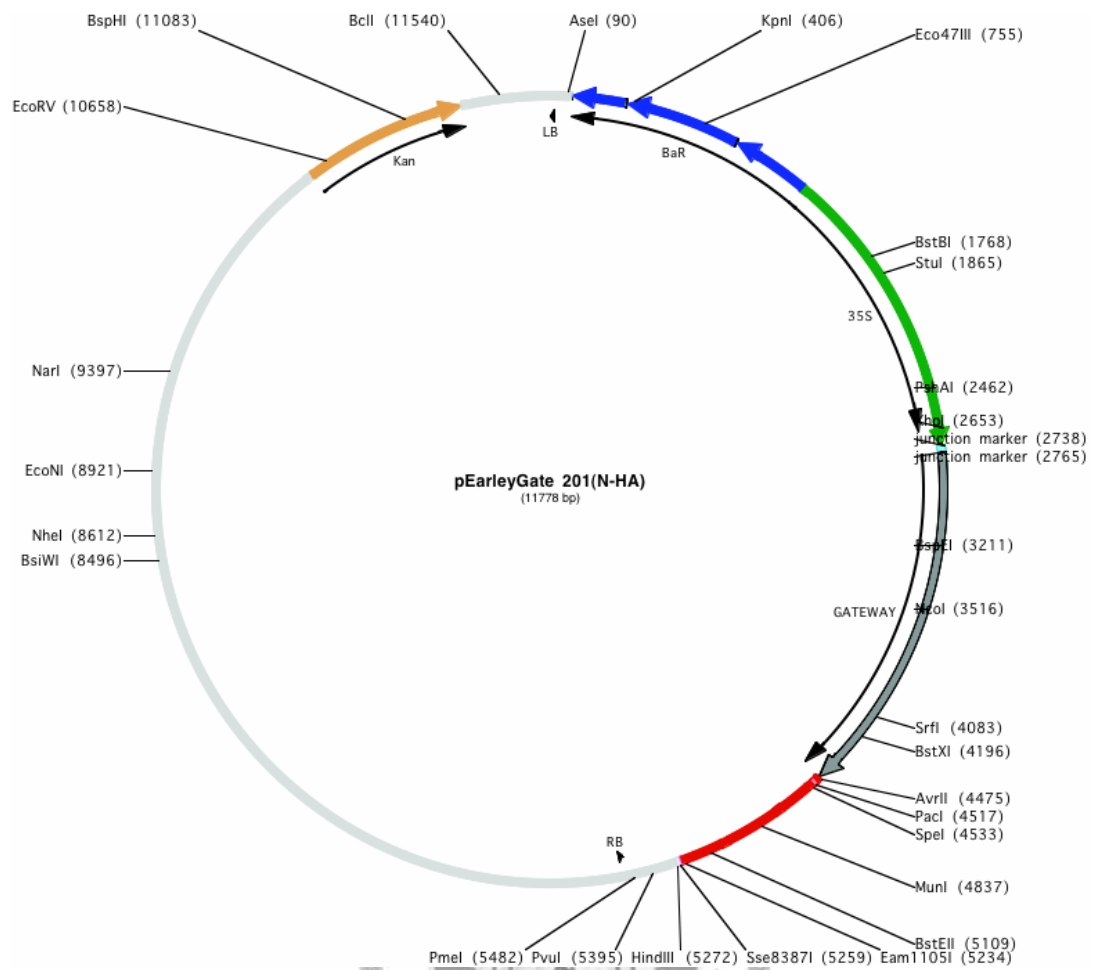
component	per 10 mL
0.8 mannitol	5 mL
1 M MgCl ₂	150 µL
0.1 M MES, pH 5.7	400 µL
ddH ₂ O	4.45 mL

PEG solution

component	per 10 mL
PEG 4000	4 g
1 M CaCl ₂	1 mL
0.8 M mannitol	2.5 mL
ddH ₂ O	3 mL



附錄六、用於 TA clone 的 pCR[®]8/GW/TOPO[®]載體。
 購買自 invitrogen 公司，圖片截取來自以下網站：
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcr8gwtopo_man.pdf

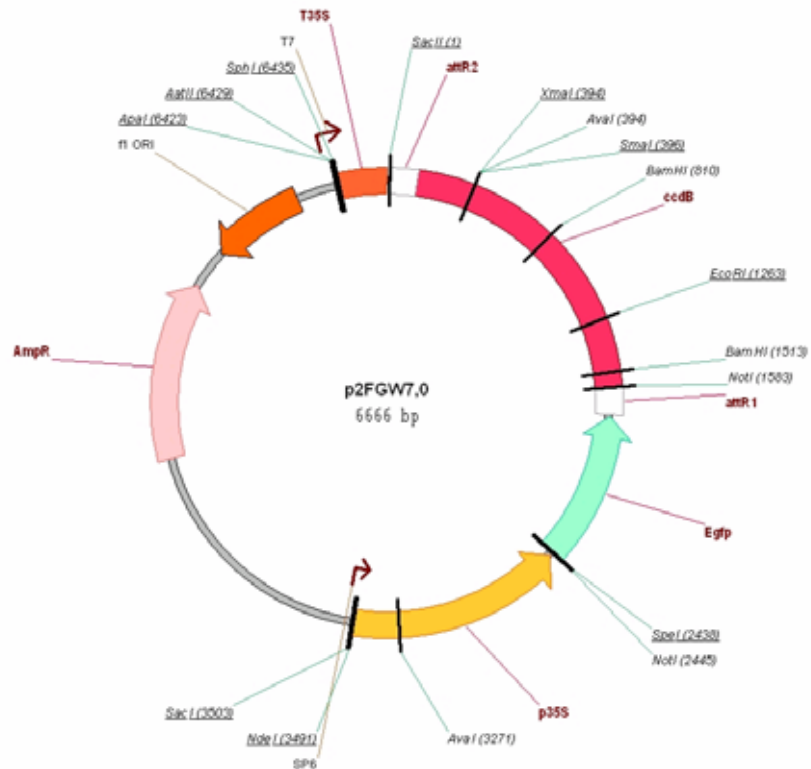


附錄七、阿拉伯芥及菸草轉殖所用載體。
 pEarleyGate 201 轉殖載體，帶有 HA tag 可用於 antibody 辨認，利用 35S 啟動子過量表現 SIZFP。

A.



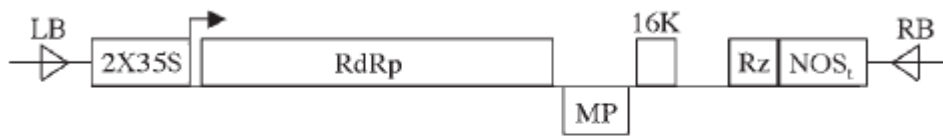
B.



附錄八、表現 SIZFP 綠色螢光重組蛋白所使用的載體。

- A. p2FGW7, GFP 重組在 SIZFP 的 N 端, 以 35S 啟動子過量表現 SIZFP 綠色螢光重組蛋白。
- B. p2GWF7, GFP 重組在 SIZFP 的 C 端, 以 35S 啟動子過量表現 SIZFP 綠色螢光重組蛋白。

pTRV1



pTRV2



附錄九、TRV-based VIGS vectors. TRV cDNA clones were placed in between duplicated CaMV 35S promoter (2X35S) and NOS terminator (NOST) in a T-DNA vector. RdRp, RNA-dependent RNA polymerase; 16K, 16-kDa cysteine rich protein; MP, movement protein; CP, coat protein; LB and RB, left and right borders of T-DNA, respectively; Rz, self-cleaving ribozyme; MCS, multiple cloning sites. (Dinesh-Kumar *et al.*, 2003)

