

國立臺灣大學生物資源暨農學院植物病理與微生物學系

碩士論文

Department of Plant Pathology and Microbiology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

探討 *NtWAKL14* 在 OPEL 引發之植物防禦反應的角色

Investigate the role of *NtWAKL14* in OPEL-induced
plant immune responses

郭芃妤

Peng-Yu Kuo

指導教授：劉瑞芬 博士


Advisor: Ruey-Fen Liou, Ph.D

中華民國 111 年 7 月

July 2022



致 謝




用水深火熱形容研究生生活真是再貼切不過。直到實驗數據收完，為了專心寫論文把自己關在房間裡的時候，我才發現自己真的已經很長一段時間過著不分平日假日白天黑夜每天去實驗室報到的日子。不用多說，撰寫論文的過程也如魔鬼的試煉一般，在此之前從未知道原來頭腦也能有虛脫的感覺。現在論文終於完成，生活空出了一塊，這才第一次對自己的碩士生生涯進行回顧。大學畢業時因為對未來方向不明確，只抱著試試看的心態就跑來讀碩士班，實際為自己的題目和實驗花費心力時，才知道入學前做的覺悟根本只是個玩笑。然而我十分幸運，在中非 403 實驗室遇到一群溫暖可靠的人們，要是沒有他們的各種幫助，我一定無法完成碩士學業。

謝謝我的指導教授劉瑞芬老師，老師定期舉辦的書報討論 (journal club) 給予我們紮實的學識基礎與閱讀能力訓練，也謝謝您耐心指導並帶領我完成實驗與論文。謝謝張雅君老師平時也撥空參與我們的報告並提供建議。兩位老師都非常親切和善，謝謝您們願意耐心聆聽學生的聲音，並在實驗或生活上給予許多建議，協助我們跨過了各種困難。謝謝實驗室的學長姐在我們剛進實驗室，還什麼都不懂的時候，手把手帶我們做實驗，還願意無私地分享你們的心得與技巧。謝謝與我同屆以及比我小一屆的同學們，你們都是富有智慧與熱情的人，和你們一起無論是討論實驗還是廢話閒聊，都是最充實且開心的時刻。最後要謝謝我的父母，謝謝你們給我的無償支援與絕對支持，讓我能不為生活擔憂，專心完成碩士學業。

進入實驗室，學習各種實驗技術並做出屬於自己的研究成果，雖然過程中遭遇許多意外與困難，但回想起來也是十分難得的經驗。現在兩位老師要退休了，同學們都要找工作了，我們都正要邁向人生的下個階段。祝福老師與同學們未來都能過得健康快樂平安，有空再約出來一起吃飯！

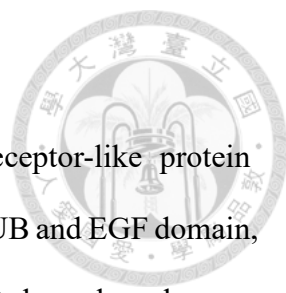
摘要



Wall-associated receptor kinases (WAKs) 是植物特有的一群 receptor-like protein kinases (RLKs)，其結構包含位於胞外的 WAK-GUB 域與 EGF 域、跨膜域以及胞內的蛋白激酶域。WAKs 與序列相似的 WAK-likes (WAKLs) 為龐大的基因家族，部分成員作為植物細胞壁果膠受體，和細胞擴展、植物發育有關；部分則與植物防禦反應有關，在植物受病原入侵等特定刺激時被誘導表現，但不同植物的 WAKs 與 WAKLs 參與防禦反應的機制不盡相同。雖然 WAKs 與 WAKLs 已被證實參與多種植物對真菌及細菌病原的抗性，其在植物與疫病菌交互作用的角色亟待探究。*Phytophthora parasitica* 質外體效應蛋白 OPEL 可在菸草 *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) 引發癒傷葡聚糖沉積、活性氧分子累積以及防禦相關基因表現。分析菸草以 OPEL 重組蛋白處理後的轉錄體，發現多個 WAK 與 WAKL 基因表現量顯著提升。為探討這些基因在 OPEL 引發植物免疫反應以及植物—疫病菌交互作用的角色，本研究首先進行序列分析，發現這些菸草 WAKs 與 WAKLs 大多具有典型的 WAK 蛋白結構；親緣分析結果顯示菸草除具有阿拉伯芥 WAKs 的直系同源性基因 (orthologs) 外，還含有其他數個支序群。qRT-PCR 分析發現處理 OPEL 重組蛋白與接種 *P. parasitica* 可誘導特定菸草 WAK 與 WAKL 候選基因的表現，包括 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2*。於圓葉菸草暫表現 *NtWAKL14x1*-GFP，發現其位於植物細胞膜。藉由 cucumber mosaic virus (CMV) 於 *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) 誘導靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2*，可降低 OPEL 引發之癒傷葡聚糖沉積與細胞死亡等植物防禦反應，並促進疫病菌感染。這些結果顯示 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 正向調控 OPEL 引發的防禦反應，也是首次發現 WAKL 參與植物對卵菌的抗性，其詳細作用機制有待後續探究。

關鍵字：OPEL、Wall-associated receptor kinases、CMV 誘導基因靜默、疫病菌、基礎防禦反應

Abstract



Wall-associated receptor kinases (WAKs), a subfamily of receptor-like protein kinases (RLKs) found only in plants, consist of extracellular WAK-GUB and EGF domain, transmembrane domain, and intracellular kinase domain. WAKs and its homologs, known as WAK-like (WAKLs), play diverse roles in plants. Some WAKs associate with pectin in plant cell wall and take part in the regulation of plant cell expansion and development, whereas some are involved in defense responses through various mechanisms. Although the roles of WAKs and WAKLs in plant interactions with fungal and bacterial pathogens have been well studied, their contribution to plant resistance against the oomycetes remains largely unknown. OPEL, an apoplastic effector from *Phytophthora parasitica*, can induce callose deposition, ROS production, and defense gene expression in *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN). Previous study based on transcriptome analysis found several *NtWAKs* and *NtWAKLs* were significantly induced by OPEL treatment. Here, we further characterized these genes to investigate their roles in plant immune responses toward OPEL and *P. parasitica*. Sequence analysis indicates most of these candidate genes contain predicted protein structure similar to that of typical WAKs. Phylogenetic analysis showed some of these *NtWAKs* are orthologous to *AtWAKs* from *Arabidopsis thaliana*, whereas others form distinct clades. Analysis by qRT-PCR demonstrated the induction of specific *NtWAKs* and *NtWAKLs* after OPEL treatment and *P. parasitica* inoculation, including *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2*. When overexpressed on *Nicotiana benthamiana*, *NtWAKL14x1*-GFP localized in the plasma membrane. Downregulation of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* by cucumber mosaic virus (CMV)-mediated gene silencing compromised OPEL-induced callose deposition and cell death, whereas enhanced *P. parasitica* infection on *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN). These results indicate *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* function as positive regulators of plant defense

response toward OPEL and *P. parasitica*. This is the first report of *WAKL* genes to participate in the plant-oomycete interaction. Further investigations are needed for better understanding of the underlying mechanism.

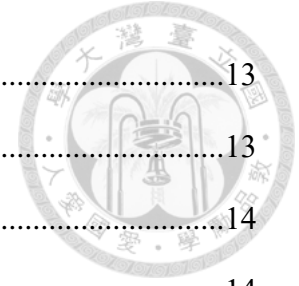


Keywords: CMV-mediated gene silencing, OPEL, *Phytophthora parasitica*, Plant innate immunity, Wall-associated receptor kinases

目 錄



口試委員審定書	
致 謝	i
摘 要	ii
Abstract.....	iii
前 言	1
1. 植物防禦反應	1
2. 植物 PRRs.....	2
3. Wall-associated receptor kinases (WAKs).....	3
4. WAKs 與植物生長	3
5. WAKs 與 WAKLs 在植物非生物性逆境之角色	4
6. WAKs 與 WAKLs 在植物生物性逆境之角色	4
7. 糖苷水解酶在植物防禦反應的角色	5
8. 疫病菌	6
9. 疫病菌外泌蛋白 OPEL 在植物防禦反應扮演的角色	7
10. 研究動機	8
材料與方法	9
1. 親緣關係分析與蛋白質結構預測	9
2. 植物材料與生長條件	9
3. OPEL 重組蛋白表現及純化	10
4. 疫病菌 (<i>P. parasitica</i>) 接種	11
4.1 疫病菌全株接種	11
4.2 疫病菌離葉接種	11
5. 抽取植物 RNA 與製備 cDNA	11
6. 即時定量聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR).....	12
7. 載體構築	13



7.1 暫表現 (transient expression) 載體建構.....	13
7.2 病毒介導基因靜默載體建構.....	13
8. 以農桿菌浸潤法 (agroinfiltration) 暫表現基因	14
9. 利用共軛焦顯微鏡觀察植物細胞內螢光蛋白分布	14
10. 以農桿菌感染法 (agroinfection) 進行 CMV 誘導基因靜默.....	15
11. 癒傷葡聚醣之測定	15
12. 偵測細胞離子滲漏.....	15
結 果.....	17
1. <i>NtWAKs</i> 與其同源性基因之親緣關係與結構域分析	17
2. OPEL 重組蛋白之純化與蛋白引發植物防禦反應的活性.....	18
3. <i>NtWAKs</i> 與 <i>NtWAKLs</i> 之表現量受 OPEL 誘導.....	19
4. 疫病菌感染誘導 <i>NtWAKs</i> 與 <i>NtWAKLs</i> 候選基因表現.....	19
5. <i>NtWAKL14x1</i> -GFP 分布於植物細胞膜.....	20
6. 植物生長與表觀不受 <i>NtWAKL14x1</i> 與 <i>NtWAKL14x2</i> 靜默之影響.....	20
7. 同時靜默 <i>NtWAKL14x1</i> 與 <i>NtWAKL14x2</i> 降低 OPEL 引發植物基礎防禦反應 的能力	21
8. 同時靜默 <i>NtWAKL14x1</i> 與 <i>NtWAKL14x2</i> 降低 <i>N. tabacum</i> 對疫病菌之抗性.....	22
討 論.....	23
1. CMV 介導基因靜默 <i>NtWAKL14x1</i> 與 <i>NtWAKL14x2</i>	23
2. <i>NtWAKL14x1</i> 與 <i>NtWAKL14x2</i> 在 OPEL 引發防禦反應的角色.....	24
3. <i>WAK2</i> -like 基因在植物防禦反應中的角色.....	26
4. 結語.....	27
引用文獻.....	28
附 表.....	35
附 圖.....	36
附 錄.....	51


前言



1. 植物防禦反應

植物的生長過程時刻面臨環境中病原微生物的挑戰，因此演化出多種位於細胞膜表面或細胞內的受體，可辨識來自病原微生物或植物之分子，以適時啟動防禦反應。以往將植物防禦反應區分為 pattern-triggered immunity (PTI) 與 effector-triggered immunity (ETI)。PTI 由細胞膜表面受體 pattern recognition receptors (PRRs) 辨識 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)、microbe-associated molecular patterns (MAMPs) 或 damage/danger-associated molecular patterns (DAMPs) 後啟動；PAMPs 為病原微生物之保守分子構造，DAMPs 為細胞壁受病原菌分解產生之衍生物或植物細胞感知危險而釋放之分子。ETI 由存在細胞內之 nucleotide-binding, leucine-rich repeat receptors (NLRs) 直接或間接辨識病原菌效應子 (effectors) 所引起 (Boller and He 2009; Jones and Dangl 2006; Zhou and Zhang 2020)。

然而有些特殊的例子，例如番茄葉霉病菌 *Cladosporium fulvum* 的質外體效應蛋白 (apoplastic effector) Avr4 (以下稱為 Cf-Avr4) 可與病原菌細胞壁之幾丁質結合，保護菌絲免被植物幾丁質酶分解 (Thomas et al. 1997; van den Burg et al. 2003; van den Burg et al. 2006)。起先未於其他菌種發現 Avr4 同源蛋白，因此認為其屬典型的種族特異性效應子 (race-specific effector) (Thomma et al. 2011)。然而近年基因組研究顯示，香蕉葉斑病 (Black Sigatoka disease) 病原真菌 *Mycosphaerella fijiensis* 具有 Cf-Avr4 的同源蛋白 Mf-Avr4 (Stergiopoulos et al. 2010)。有趣的是，Mf-Avr4 與 Cf-Avr4 同樣可被具有 leucine rich repeat (LRR)-receptor like protein (RLP) Cf-4 的番茄辨識並引發過敏性反應 (hypersensitive response, HR) (Stergiopoulos et al. 2010)；野生茄屬植物 *S. peruvianum*、*S. chmielewskii* 與 *S. parviflorum* 的 Cf-4-like 蛋白也皆能辨識 Cf-Avr4 (Laugé et al. 2000; Kruijt et al. 2004)。因此 Avr4 與其同源蛋白可被歸類為 PAMPs，而 Cf-4 可歸為 PRR (Thomma et al. 2011)。由上述 Avr4 的研究成果可瞭解到，隨著植物-病原菌交互作用之探討變得深入，效應子與 PAMP 的界



線變得模糊，因此有學者認為先前將植物防禦反應劃分為 PTI 與 ETI 的分類方式需做修正。Ding et al. (2021) 建議依據植物細胞最先辨識 elicitor 的位置，將免疫反應區分為 surface-receptor-mediated immunity (SRMI) 與 intracellular-receptor-mediated immunity (IRMI)。

近年研究顯示，由細胞表面或胞內受體引發的防禦反應之間會互相影響。透過處理 PAMPs 或在植株轉基因表現胞內效應蛋白，創造植物可單獨啟動細胞表面受體或胞內受體介導防禦反應的環境，發現由胞內受體啟動的 HR 也需要細胞表面受體的參與，其活化可增強 HR (Ngou et al. 2021; Yuan et al. 2021)；另一方面，當細胞表面受體辨識到病原菌，會活化多個蛋白激酶與 NADPH 氧化酶，而胞內受體可透過數種機制使前述蛋白之基因表現量增加，達到強化免疫反應的效果 (Ngou et al. 2021)。因此，僅靠任何一個防禦系統皆不足以充分提供植物對細菌病原 *Pseudomonas syringae* 的抗性，必須兩系統相互強化才能使植物成功抵禦病原菌的感染 (Ngou et al. 2021)。

2. 植物 PRRs

胞外域是 PRRs 接收配位子 (ligands) 的區域，根據其序列特性與結構可區分為 leucine-rich repeat (LRR)、lysin motif (LysM)、lectin、malectin 以及 epidermal growth factor-like (EGF-like) domain 等，各自負責辨識特定類別的 patterns (Boutrot and Zipfel 2017)。另外根據胞內蛋白激酶域 (kinase domain) 之有無，PRRs 可分為 receptor-like kinases (RLKs) 以及 receptor-like proteins (RLPs)。大多數 PRRs 需與 BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1)-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1)、CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1 (CERK1) 及 SUPPRESSOR OF BIR1-1 (SOBIR1) 等輔受體 (co-receptors) 交互作用才能活化下游免疫反應，例如 LRR-RLPs 需要 SOBIR1 與 BAK1 (Liebrand et al. 2013)，而 LysM-RLK (LYKs) 及 LysM-RLP (LYMs) 需要 CERK1 (Cao et al. 2014; Miya et al. 2007; Willmann et al.

2011)。這些輔受體在陸生植物物種間具高度保守性，在 PRRs 所介導之防禦反應中扮演十分重要的角色 (Ngou et al. 2022)。



3. Wall-associated receptor kinases (WAKs)

Wall-associated receptor kinases (WAKs)是一群只在植物發現的 RLKs，蛋白之典型結構包含位於胞外的 WAK-GUB 域 (GUB: galacturonan-binding) 與 EGF-like 域、跨膜域 (transmembrane domain, TM)，以及胞內蛋白激酶域 (kinase domain) (He et al. 1996)。另有一群與 WAK 序列相似的 wall-associated receptor kinase-likes (WAKLs) 蛋白，結構上可能缺少 WAK-GUB 域或 EGF-like 域 (Verica and He 2002)。

近年基因組分析顯示，*WAK* 與 *WAKL* 為龐大的基因家族，無論雙子葉植物或單子葉植物皆含有許多 *WAK* 與 *WAKL* 基因。雙子葉植物中，阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 有 5 個 *WAK* 基因與 22 個 *WAKL* 基因 (Verica and He 2002)；棉花 (*Gossypium hirsutum*) 有 23 個 *WAK* 基因與 76 個 *WAKL* 基因 (Zhang et al. 2021)。單子葉植物中，水稻 (*Oryza sativa*) 有總數 125 個 *WAK* 與 *WAKL* 基因 (Zhang et al. 2005)；小麥 (*Triticum aestivum*) 則有總數 320 個 *WAK* 與 *WAKL* 基因 (Xia et al. 2022)。

4. WAKs 與植物生長

早期研究指出，*WAKs* 是參與植物生長調控的重要基因：*AtWAK1* 可與細胞壁之長鏈果膠分子以及短片段寡聚半乳糖醛酸 (oligogalacturonic acid) 結合 (Kohorn et al. 2006)；相似地，*AtWAK2* 可與果膠中常見之去酯化 (de-esterified) 半乳糖醛酸主鏈 (backbone) 結合 (Kohorn et al. 2009)。兩者同為植物細胞壁果膠受體，被認為具有感知細胞壁成分改變，並調控植物生長相關反應的功能，在植物胞外對胞內之訊息傳遞過程扮演重要角色 (Kohorn and Kohorn 2012)。利用轉基因 RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) 技術靜默水稻 *WAK* 基因，發現不同基因可能參與植


株不同生長階段的調控：如靜默 *OsiWAK1* 會造成植株矮化，顯示該基因調控水稻營養生長階段的發育 (Kanneganti and Gupta 2011)；靜默 *OsWAK91* 不影響水稻的營養生長，卻會導致雌配子體無法正常發育，說明該基因參與水稻生殖生長階段的調控 (Wang et al. 2012)。

5. WAKs 與 WAKLs 在植物非生物性逆境之角色

WAKs 與 *WAKLs* 也參與植物對非生物逆境的抗性，如過表現 *AtWAK1* 可提升阿拉伯芥植株對鋁元素的耐受性 (Sivaguru et al. 2003)；相對地，甜椒 (*Capsicum annuum* L.) *CaWAKL20* 基因則透過降低離層酸 (abscisic acid, ABA) 相關基因之表現，負向調控植株對高溫的耐受性 (Wang et al. 2019)。Xia et al. (2018) 發現，在銅過量的環境中，*OsWAK11* 可能藉由調控 pectin methylesterase (PME) 改變水稻細胞壁甲酯化 (methylesterification) 的程度，讓銅停留在細胞壁，保護細胞免受其毒害。

6. WAKs 與 WAKLs 在植物生物性逆境之角色

目前尚未有 *WAKLs* 調控植物生長的紀錄，卻有許多證據顯示 *WAKs* 和 *WAKLs* 與植物對細菌及真菌之抗性有關。例如：*AtWAK1* 能辨識植物細胞壁果膠被分解後產生的 oligogalacturonides (OGs)，其可作為 DAMPs 引發防禦反應 (Brutus et al. 2010)；水稻 *WAK* 基因 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* resistance 4 (*Xa4*) 透過促進纖維素合成與增加細胞壁強度阻礙細菌入侵 (Hu et al. 2017)。另外，也有作為輔受體協助 PRRs 辨識 PAMPs 的例子，例如番茄 *SlWAK1* 可與 FLAGELLIN SENSITIVE2 (FLS2) 結合並辨識 flg22 (Zhang et al. 2020)；棉花 *GhWAK7A* 則與 CERK1 以及 LYSIN-MOTIF RECEPTOR KINASE5 (LYK5) 結合，協助其辨識幾丁質並引發防禦反應 (Wang et al. 2020)。此外，甜橙 (*Citrus sinensis*) 的 *CsWAKL08* 正向調控植物對細菌性柑橘潰瘍病 (Citrus bacterial canker, CBC) 的抗性 (Li et al. 2020)；阿拉伯芥 *AtWAKL22* (*RFO1*) 與植物對多支 *Fusarium* 生理小種 (race) 的抗性有關



(Diener and Ausubel 2005)。另外，有 WAKLs 透過辨識特定效應蛋白，引發生理小種專一性 (race-specific) 抗性：如 WAKL 基因 *Rlm9* 致使 *Brassica napus* 對具有 AvrLm5-9 的病原真菌 *Leptosphaeria maculans* 產生抗性 (Larkan et al. 2020)；WAKL 基因 *Stb6* 致使小麥 (*Triticum aestivum*) 對具有 AvrStb6 的 *Zymoseptoria tritici* 生理小種有抗性 (Saintenac et al. 2018)。

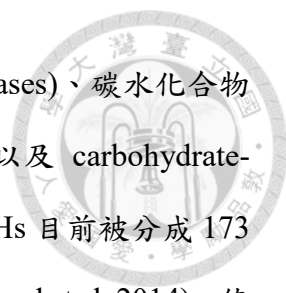
另一方面，WAKs 也可能是植物的感病因子 (susceptibility factor)。如病原真菌 *Parastagonospora nodorum* 產生的蛋白 SnTox1 藉由與小麥 WAK 基因 *Snn1* 結合，誘發細胞凋亡，有利於 necrotrophic 階段的病原菌從死亡之植物組織獲得養分 (Faris and Friesen 2020)。

綜上所述，誘發 WAKs 與 WAKLs 相關防禦反應之物質，涵蓋範圍由植物細胞壁衍生之醣類，至病原菌產生的蛋白，不同基因參與防禦反應的機制也不盡相同。然而種種例子均顯示 WAKs 與 WAKLs 確實在植物免疫反應之調控具有重要角色。

7. 糖苷水解酶在植物防禦反應的角色

植物細胞壁由纖維素 (cellulose)、半纖維素 (hemicellulose) 與果膠 (pectin) 等多醣組成，為阻擋病原微生物入侵細胞的重要基礎防線。許多病原微生物為此演化出一系列細胞壁分解酵素 (cell wall-degrading enzyme, CWDEs)，包含果膠酶 (pectinases)、多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonases)、葡聚醣酶 (glucanases)、纖維素酶 (cellulases) 以及木葡聚醣酶 (xyloglucanases) (Nühse 2012) 等；這些細胞壁分解酵素的功能除了促進病原菌侵染，其分解產物更能作為病原菌的營養來源，故為病原菌重要的致病因子 (virulence factor) (Morales-Cruz et al. 2015; Pérez-Hernández et al. 2017)。

細胞壁分解酵素中，可將結構複雜之碳水化合物與多醣分解為小分子的酵素稱為 carbohydrate-active enzymes (CAZymes) (Kameshwar et al. 2019)。依據作用方式，CAZymes 被分為六類，包含糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GHs)、醣基轉




移酶 (glycosyltransferases, GTs)、多醣裂解酶 (polysaccharide lyases)、碳水化合物酯酶 (carbohydrate esterases)、auxiliary activity (AA) enzymes 以及 carbohydrate-binding modules (CBMs) 等；根據胺基酸序列與結構相似度，GHs 目前被分成 173 個基因族，是 CAZymes 中數量最多且多樣性最高的類群 (Lombard et al. 2014)。值得一提的是，並非所有病原菌基因組中皆包含所有 GHs 基因族，例如 GH7 只存在於真菌與卵菌，而未出現在細菌和古菌 (archaea) 的基因組 (Payne et al. 2015)。

近年發現數個 GHs 在真菌和卵菌之侵染、病原性 (pathogenicity) 以及致病力 (virulence) 扮演重要角色，如在感染番茄與馬鈴薯的病原真菌 *Colletotrichum coccodes* 與土媒病原真菌 *Verticillium dahliae*，果膠裂解酶 (pectate lyases) 為致病因子 (virulence factor)，可增強病原菌引發之病徵 (BEN-DANIEL et al. 2012; Yang et al. 2018)。PsGH7a 編碼大豆莖腐與軟腐病原菌 *Phytophthora sojae* 的纖維素酶，其屬於 GH7，在病原菌侵染過程表現量會大幅提升 (Tan et al. 2020)，說明該基因對病原菌之侵染能力與致病力具有重要性。

GHs 是幫助病原菌侵染的重要酵素，有趣的是，這些酵素也可能被植物辨識，進而導致防禦反應被啟動。有研究指出 *P. sojae* 的木葡聚醣酶 XEG1 不僅是病原菌侵染寄主時重要的致病因子，也可作為 PAMPs 被植物辨識並引發 PTI，且其引發 PTI 反應的能力與酵素活性無關 (Ma et al. 2015)；病原真菌 *V. dahliae* 的果膠裂解酶 VdPEL1 與角質分解酵素 VdCUT11 (cutinase) 也會作為 PAMPs 啟動植物免疫反應 (Muchero et al. 2018; Yang et al. 2018)。

8. 疫病菌

疫病菌 (*Phytophthora* spp.) 屬於卵菌，常在許多重要經濟作物和林木生態系統造成重要病害 (Hansen 2015)，如馬鈴薯晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 曾導致 19 世紀的愛爾蘭大饑荒 (Haas et al. 2009)。儘管疫病菌在形態上與真菌相似，但兩者在基因、生理和生化各方面都存在許多差異，例如幾丁質為真菌細胞壁重要成分，



卻只佔卵菌細胞壁一小部分，導致針對幾丁質合成途徑設計的化學藥劑只能應用於防治真菌病害，卻無法對卵菌發揮效用 (Latijnhouwers et al. 2003; Werner et al. 2002)。栽種抗病植株是目前對疫病菌病害最有效、最友善生態且最經濟的防治策略。從分子層次瞭解疫病菌－植物交互作用，不僅有助於抗病植株的研發，也是發展永續防治策略前必須下的功夫 (Naveed et al. 2020)。

9. 疫病菌外泌蛋白 OPEL 在植物防禦反應扮演的角色

Phytophthora parasitica 為臺灣重要病原菌之一，其外泌蛋白 OPEL 為質外體效應蛋白，保留域分析顯示 OPEL 包含 N 端的 signal peptide、thaumatin-like domain、glycine-rich domain 以及 glycosyl hydrolase (GH) domain。OPEL 是卵菌特有的基因，其同源性基因 (homologues) 只在 *Phytophthora* spp. 與其他卵菌如 *Hyaloperonospora arabidopsidis*、*Pythium ultimum* 以及 *Albugo laibachii* 被發現 (Chang et al. 2015)。

將 *P. parasitica* 接種於圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 時，OPEL 基因表現量於接種後 12 小時明顯提升，顯示 OPEL 很可能參與疫病菌感染早期。將 OPEL 重組蛋白注射於 *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片可引發細胞死亡、癒傷葡聚糖沉積、活性氧分子 (ROS) 累積，以及誘導水楊酸 (salicylic acid, SA) 與 PTI 相關基因表現。另由序列分析得知 GH domain 具有 β -1,3-glucanase 的保守性區段，將該酵素活性位點突變會減弱 OPEL 引發 ROS 累積與癒傷葡聚糖沉積等能力 (Chang et al. 2015)。*P. parasitica* 含有四個與 OPEL 有明顯保守性的同源性基因，包括 PPTG_16550、PPTG_17496、PPTG_17497 與 PPTG_17498，其中 PPTG_16550 也具有引發植物防禦反應的活性 (陳，2019)。

收集預處理 OPEL 重組蛋白之 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片的質外體液 (apoplastic fluid, AF)，打回 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片可引發細胞死亡，顯示 AF 可能含有 OPEL 分解植物組成產生的 DAMPs (楊，2020)。然而需注意的是，

酵素活性位點突變使 OPEL 引發防禦反應的能力減弱，而非完全消失，因此不能完全排除 OPEL 作為 PAMP 被植物辨識的可能性 (楊，2020)。

為瞭解 OPEL 引發植物防禦反應所涉機制，柯 (2019) 分析 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 以 OPEL 重組蛋白處理 6 小時後之轉錄體。相較於處理 MES buffer 的控制組，處理 OPEL 引發許多基因的差異表現，這些基因多與逆境反應與多醣辨識有關。另外，在 OPEL 重組蛋白處理下，碳的固定與利用和光合作用相關基因多受負向調控；醣類代謝、胺基酸代謝、荷爾蒙合成、次級代謝物合成、MAPK 訊息傳導、逆境反應以及植物防禦調控相關轉錄因子等基因則受正向調控。差異表現基因中，被註解為轉錄因子者，其蛋白產物以 WRKYs、AP2-EREBP (APETALA2/ethylene-responsive element binding protein) 以及 MYBs 為主，可能參與調控植物防禦基因之誘導表現。綜合上述，轉錄體分析結果顯示 OPEL 引發的植物防禦反應可能涉及 receptor-like cytoplasmic kinases (RLCKs) 與 MAPK cascade 訊息傳導路徑，並透過 WRKYs、AP2-EREBP 與 MYBs 調控植物防禦相關基因表現。

10. 研究動機

根據前述轉錄體分析結果，多個 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 的 *WAKs* 與 *WAKLs* 基因也在被 OPEL 誘導表現的基因群中。有鑑於目前關於 *WAKs* 與 *WAKLs* 的研究都集中於植物對真菌與細菌病原的抗性，缺乏對於疫病菌等卵菌抗性的研究，菸草 *WAKs* 與 *WAKLs* 的功能也幾乎不曾被探討。因此，本研究探討菸草 *WAKs* 和 *WAKLs* 是否參與 OPEL 引發之植物防禦反應，以助瞭解 *WAKs* 與 *WAKLs* 在植物-疫病菌交互作用的角色，也希望對 OPEL 的作用機制有更多認識。

材料與方法



1. 親緣關係分析與蛋白質結構預測

自 National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 取得 *Nicotiana tabacum*、*Arabidopsis thaliana* 與 *Camelina sativa* 之 WAK 與 WAKL 蛋白質全長序列；應用 Sol Genomics Network (SGN) (<https://solgenomics.net/>) 的 Blast 工具自 SGN 資料庫蒐集 *Nicotiana sylvestris*、*Nicotiana tomentosiformis*、*Solanum tuberosum* 與 *Solanum lycopersicum* 之 WAKs 與 WAKLs 同源性序列；自 Cotton Functional Genomics Database (CottonFGD) (<https://cottonfgd.net/>) 取得 *Gossypium hirsutum* 之 WAKs 與 WAKLs 蛋白全長序列；自 Rice Genome Annotation Project (RGAP) (<http://rice.uga.edu/index.shtml>) 蒐集 *Oryza sativa* 之 WAKs 與 WAKLs 蛋白全長序列。利用 MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 進行多序列併列分析 (參數設定：於進階設定勾選 strategy "E-INS-i"、"leave gappy regions"，其餘依照網站預設之選項)，並於軟體 MEGA 11 (Tamura et al. 2021) 以 neighbor-joining algorithm 建立親緣關係樹，bootstrap 分析設定 1,000 pseudoreplicates。使用 iTOL v6 (<https://itol.embl.de/>) 為親緣樹進行顏色與形狀等修飾。利用 InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 與 SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>) 預測蛋白結構域，並使用軟體 DOG 2.0 (Ren et al. 2009) 繪製結構域示意圖。

2. 植物材料與生長條件

本研究使用之植物材料包含 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 與圓葉菸草。將植物種子點播於裝有過篩泥炭土之穴盤，待種子發芽並長成幼苗 (約 11-13 天大)，將其移植至與蛭石、珍珠石混拌之泥炭土 (比例 1:1:4)。置於 25°C 的植物生長室，以每日光照 16 小時/黑暗 8 小時之條件培植。



3. OPEL 重組蛋白表現及純化

帶有表現載體 pGEX-4T-1::OPEL 的 *Escherichia coli* RIL (DE3) 菌株 (Chang et al. 2015) 平時存放於-80°C之冷凍櫃。純化蛋白前，以畫線平板法將保存於-80°C的轉型菌株塗佈於 LA 培養基 (含 100 ppm ampicillin)，於 37°C 靜置培養 12-18 小時。取單一菌落接種至 100 mL LB 培養基 (含 100 ppm ampicillin)，於 37°C 以 225 rpm 震盪培養 12-18 小時。取 20 mL 菌液，加入 1 公升 LB 培養基 (含 100 ppm ampicillin)，於 37°C 以 225 rpm 震盪培養至 O.D.₆₀₀ = 0.8-1.0。將菌液置於 4°C 降溫，待冷卻後加入 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)，使終濃度為 0.2 mM，再於 16°C 以 225 rpm 震盪培養。兩天後，於 4°C 以 8000 rpm 離心 5 分鐘並倒除上清液，以 200 mL PBS buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) 回溶菌塊，並以 Avestin Emulsoflex-C3 高壓細胞破碎機 (ATA Scientific, Taren Point, NSW, Australia) 破菌。

將破菌完成之菌液移至 4°C 以 13,000 rpm 離心 30 分鐘。利用 0.45 μm 針筒過濾器過濾上清液，並加入 Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)，於 4°C 反應 2.5 小時。將含膠體之蛋白液於 4°C 以 500 rpm 離心 5 分鐘後，將上清液小心吸除。以 10 mL PBS 流洗膠體，接著以 15 mM reduced glutathione 之 50 mM Tris-HCl 溶液 20-25 mL 將蛋白洗離膠體。以每管 1 mL 之體積收集蛋白液，並利用 12.5% SDS-PAGE 分析 OPEL-GST 蛋白於各管樣品之存在情形。

收集含 OPEL-GST 蛋白液，以濃縮管 Vivaspin 20 (10 kDa MWCO Polyethersulfone; GE Healthcare) 將體積濃縮至 1-1.5 mL。再與 1.5 U thrombin (10 U/mg protein, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 於 10°C 反應 1 小時，以切除 GST。

利用 0.22 μm 針筒過濾器過濾上述 thrombin 反應產物，使用 GE AKTA Purifier 100 FPLC System 與 HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution column (GE Healthcare) 進行凝膠過濾層析，以 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 作為流洗緩衝液。設定流速 0.3 mL/min，每 0.5 mL 流洗液收集成一管，再以 12.5% SDS-PAGE 分析各

管之蛋白成分。收集含有 OPEL 蛋白的溶液，再次以濃縮管 Vivaspın 20 (10 kDa MWCO Polyethersulfone) 將體積濃縮至 1.5-2 mL。

利用 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 進行蛋白定量 (Bradford, 1976)，以 Bovine Serum Albumin (BSA) 作為蛋白濃度標準品。

4. 疫病菌 (*P. parasitica*) 接種

4.1 疫病菌全株接種

將 *P. parasitica* strain 94069 菌絲塊接種於 10% V8 培養基，於 25°C 避光培養 7 天後，將覆滿菌絲的培養基切碎，於無菌水中照光浸泡 36-48 小時以誘導孢囊。欲誘導游走子時，將已誘導孢囊的培養基置於 4°C 低溫環境 15-20 分鐘。接著用紗布將菌絲塊與菌絲濾除，將游走子懸浮液濃度調整至 10^4 - 10^5 spores/mL。使用噴瓶將游走子懸浮液均勻噴灑至植株全體。完成後將植株置於 28°C 並且避光、高濕度之環境。於不同時間點收取葉片樣本後並保存於 -80°C 冷凍櫃，日後抽取 RNA 進行表現量分析。

4.2 疫病菌離葉接種

誘導游走子以前的操作步驟與全株接種相同。進行 *N. tabacum* 離葉接種前，利用無菌之 pipette tip 輕戳葉背製造傷口，再將 20 μ L 游走子懸浮液 (10^4 - 10^5 spores/mL) 滴在葉片傷口上，完成後將葉片置於 28°C 並且避光、高濕度之環境。接種 48 小時後觀察疫病菌感染情形，並以 Boxlite (X-Loupe, Taipei, Taiwan) 藍光作為光源，拍攝病徵照片，再利用軟體 ImageJ 計算病斑面積。

5. 抽取植物 RNA 與製備 cDNA

將植物樣本與液態氮混合並研磨至細緻粉末狀，倒入微量離心管中。使用 Plant Total RNA Extraction Kit (Viogene, Taipei, Taiwan)，依官方手冊建議之步驟抽取 RNA，

並以 NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 進行核酸之定量。

使用 TURBO™ DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific) 去除樣品中殘留之 DNA：取 10 µg RNA，補 RNase-free ddH₂O 至體積為 44 µL，再加入 5 µL 10X TURBO DNase buffer 與 1 µL TURBO DNase (2 U/µL)。混和均勻並於 37°C 靜置反應。一小時後，加入 6 µL TURBO DNA-free inactivation reagent 並等待 5 分鐘，過程中不斷彈勻樣品使之充分反應。再於室溫以 10,000 rpm 離心 2 分鐘，吸取上清液至新的微量離心管。

使用 SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) 將 RNA 反轉錄得 cDNA。取 1,000 ng DNA-free RNA，補 RNase-free ddH₂O 至體積為 12 µL，再加入 1 µL 10 mM dNTPs 和 25 µM oligo VdT (5'-T₂₅VN-3', V: A/C/G, N: A/T/C/G)，於 65°C 乾浴 5 分鐘，再移到 4°C 冰浴 2 分鐘。接著加入 4 µL 5X RT buffer、1 µL 0.1 M DTT 與 1 µL SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (200 U/µL)。於 55°C 反應 20-30 分鐘後，於 80°C 加熱 10 分鐘使反應終止。

6. 即時定量聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

配製反應溶液 (每個反應體積為 20 µL)：10 µL 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)、2 µL 5 µM 引子對 (含 2.5 µM forward primer 與 2.5 µM reverse primer) (表一)、1 µL 稀釋 3 倍之 cDNA 與 7 µL ddH₂O。

使用 StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 進行 qPCR 分析。設定反應條件：95°C 10 分鐘，95°C 15 秒，60°C 1 分鐘，共 40 個循環；最後以 95°C 15 秒，60°C 1 分鐘，95°C 15 秒進行 melting curve 分析。將 *NtWAKs* 與 *NtWAKLs* 之 C_T 值扣除 internal control (*β-actin*) 之 C_T 值，得 ΔC_T；將處理組 ΔC_T 扣除控制組 ΔC_T，得 ΔΔC_T。最終以 2^{-ΔΔC_T} 呈現基因之相對表現量。




7. 載體構築

7.1 暫表現 (transient expression) 載體建構

針對 *NtWAKL14x1* 基因 ORF 設計專用引子對：264x1_oeF 與 264x1_oeR (表一)。自 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片 cDNA 增幅取得 *NtWAKL14x1* 基因 ORF 全長片段。將基因片段導入 pENTR™/D-TOPO® 載體 (Thermo Fisher Scientific) 後，轉型至 *E. coli* DH5α 勝任細胞，塗布於 LA 培養基 (含 50 ppm kanamycin)，於 37°C 培養 12-18 小時。利用 FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Ping-Tung, Taiwan) 抽取質體，定序確認後將菌株保存於 -80°C 冷凍櫃。接著利用 Gateway cloning 將導入載體 pENTR 中的 *NtWAKL14x1* 片段轉換至 pK7FWG2，完成可表現 *NtWAKL14x1*-GFP 之載體。將載體轉型至 *E. coli* DH5α 勝任細胞，塗布於 LA 培養基 (含 50 ppm kanamycin)，於 37°C 培養 12-18 小時。以 colony PCR 確認結果後，利用 FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit 抽取過表現質體 DNA，將載體轉型至農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 中。

7.2 病毒介導基因靜默載體建構

利用中央研究院農業生物科技研究中心葉信宏博士提供之 pJLCMV20-R1、pJLCMV20-R2E、pJLCMV20-R3、pJLCMV20-35S (Tzean et al. 2019) 與 pJLCMV20-PDS (賴，2022) 進行 CMV 誘導基因靜默。建構載體前，首先利用 SGN 資料庫的 VIGS Tool (<https://vigs.solgenomics.net/>) 分析適合的短基因片段 (200 bp)，並根據該短片段設計專一性引子對 264_sF 與 264_sR (表一、附圖二)。自 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片之 cDNA 增幅取得基因片段，利用 T4 polynucleotide kinase (10 U/μL, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 將其磷酸化；利用 *AfeI* (10 U/μL, New England Biolabs) 將 pJLCMV20-R2E 截切後以 antarctic phosphatase (AP) (5 U/μL, New England Biolabs) 去除磷酸根。最後



以 T4 DNA ligase (5 U/ μ L, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 將兩產物接合，轉入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞。將細胞塗布於 LA 培養基 (含 50 ppm kanamycin)，於 37°C 培養 12-18 小時，再以 colony PCR 初步確認轉形是否成功。接著利用 FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit 抽取質體 DNA 並定序確認。最後將質體轉型至農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 中。

8. 以農桿菌浸潤法 (agroinfiltration) 暫表現基因

將帶有 pK7WG2-*GFP* 或 pK7FWG2-*NtWAKL14x1-GFP* 的農桿菌塗至含有 12.5 ppm tetracycline 和 100 ppm spectinomycin 的 LA 培養基；將帶有細胞膜標誌蛋白 *AtACA8-mCherry* 或內質網標誌蛋白 *mCherry-KDEL* 的農桿菌塗至含 50 ppm rifampicin 和 50 ppm kanamycin 的 LA 培養基。於 28°C 培養 2 天後，取適量菌泥，接種至 LB 培養基 (含 100 ppm spectinomycin)。於 28°C 以 225 rpm 震盪培養 20 小時後，取 3 mL 菌液以 5,000 rpm 離心 3 分鐘，並以 1 mL MMA infiltration buffer (10 mM MES, 10 mM MgCl₂ 和 200 mM acetosyringone) 懸浮菌塊，調整至適當濃度 (pK7WG2-*GFP* 終濃度 O.D.₆₀₀ = 0.3；pK7FWG2-*NtWAKL14x1-GFP* 終濃度 O.D.₆₀₀ = 0.6；*AtACA8-mCherry* 終濃度 O.D.₆₀₀ = 0.5；*mCherry-KDEL* 終濃度 O.D.₆₀₀ = 0.1)。於室溫以 50-75 rpm 避光震盪 1 小時後，施打至 4.5 週大之圓葉菸草。注射完成後將植株置於 25°C 植物生長室培植。

9. 利用共軛焦顯微鏡觀察植物細胞內螢光蛋白分布

利用農桿菌浸潤法於圓葉菸草同時表現 *NtWAKL14x1-GFP* 蛋白與細胞膜標誌蛋白 *AtACA8-mCherry* 或內質網標誌蛋白 *mCherry-KDEL*，36-48 小時後，利用共軛焦顯微鏡 Zeiss LSM 510 META 觀察葉片表皮細胞的螢光訊號。使用激發光 488 nm 與發射光 500-550 nm 觀察 GFP 訊號；使用激發光 543 nm 與發射光 565-615 nm 觀察 *mCherry* 訊號。



10. 以農桿菌感染法 (agroinfection) 進行 CMV 誘導基因靜默

在 CMV 誘導基因靜默系統中，需共同表現 CMV-R1、CMV-R3 與帶有目標基因片段的 CMV-R2E (Tzean et al. 2019)。將帶有上述載體的農桿菌轉型株塗至 LA 培養基 (含 50 ppm rifampicin 和 50 ppm kanamycin)，於 28°C 培養 2 天後，取適量菌泥，接種至 LB 培養基 (含 50 ppm kanamycin)。於 28°C 以 225 rpm 震盪培養 20 小時後，將 3 mL 菌液以 5,000 rpm 離心 3 分鐘，並以 1 mL MMA infiltration buffer (10 mM MES, 10 mM MgCl₂ 和 200 mM acetosyringone) 懸浮菌塊，調整濃度至 O.D.₆₀₀ = 1.0。於室溫以 50-75 rpm 避光震盪 3 小時後，將 CMV-R1、CMV-R3 與帶有目標基因片段的 CMV-R2E 以 1:1:1 比例混合 (此時三支菌株各自之終濃度為 O.D.₆₀₀ = 0.33)。施打前，先以無菌針頭輕戳葉背以製造傷口。將農桿菌施打於 2.5 週大 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 第一片真葉之葉背，注射完成後將植株置於 23°C 植物生長室培植。

11. 癒傷葡聚糖之測定

對植株施打 OPEL 重組蛋白或 MES 後放置兩天，將處理範圍之葉片剪下並以 95% 酒精褪除葉綠素。配製 0.05% (w/v) aniline blue (溶於 150 mM K₂HPO₄, pH 9.5)，將葉片浸泡其中，以 50 rpm 避光反應 16 小時。取出葉片製成簡易玻片標本，使用螢光顯微鏡 (Leica DM LB, Buffalo Grove, IL, USA；濾鏡為 Leica DMRE filter cubes A513804) 觀察癒傷葡聚糖沉積。使用 ImageJ 軟體計算癒傷葡聚糖沉積數量。

12. 偵測細胞離子滲漏

使用打洞器取得直徑 1 cm 之葉圓片並浸泡於無菌 ddH₂O 中，於 25°C 避光靜置 1 小時以除去致傷效應 (wounding effect)。以 12 孔細胞培養盤作為容器，於每孔裝入 3 mL 無菌 ddH₂O 與 3 個葉圓片，於 25°C 避光靜置 16 小時。將 ddH₂O 吸取至乾淨玻璃試管中，並利用電導度計 SC-170 (Suntex, New Taipei City, Taiwan) 讀

取電導度，得讀值 A。接著將葉圓片移至玻璃試管，以鋁箔紙包覆試管管口，並於沸水加熱 15 分鐘。將葉片移出試管，以電導度計再次讀取液體電導度，得讀值 B。計算 $\text{ion leakage} = A/B$ (Hatsugai and Katagiri 2018)。



結果



1. *NtWAKs* 與其同源性基因之親緣關係與結構域分析

對處理 OPEL 重組蛋白之 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片進行轉錄體分析，發現許多基因的表現量在 OPEL 處理後顯著改變 (Fold change ≥ 2 , p-value < 0.01) (柯，2019)，其中 246 個編碼為 RLKs 或 RLPs，包括 12 個註解為 wall-associated receptor kinase (*WAK*) 或 wall-associated receptor kinase-like (*WAKL*) 的基因 (不同 isoforms 以同一基因計數，附表一)。

為瞭解前述菸草 *WAKs* 以及 *WAKLs* (分別稱為 *NtWAKs* 和 *NtWAKLs*) 與其他植物之 *WAKs/WAKLs* 的親緣關係，自 NCBI、SGN、CottonFGD 和 RGAP 等資料庫蒐集 *WAKs* 同源性基因，分析的植物種類包含 *N. tabacum* 之親本植物 *Nicotiana tomentosiformis* 與 *Nicotiana glauca*，與菸草同屬於茄科的番茄 (*Solanum lycopersicum*) 與馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*)，十字花科的阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 與亞麻薺 (*Camelina sativa*)，以及錦葵科的棉花 (*Gossypium hirsutum*) 與單子葉植物禾本科的水稻 (*Oryza sativa*)。進行多序列併列分析後，透過 neighbor-joining 演算法建構親緣關係樹，發現可將所有序列分為三個支序群，分別標示為 I、II 以及 III (圖一)。利用 InterProScan、SMART 和 SignalP 6.0 預測各基因的蛋白結構時，發現不同支序群的蛋白結構域組成各有特色。

支序群 I 中，包含 5 個阿拉伯芥 *AtWAKs* 與 *N. tabacum* 基因 107771498、107776033、107830571、107771394、107800879、107779692 與 107817466 等 (依序定名 *NtWAK2a-NtWAK2g*，參照附表一)。 *AtWAKs* 與 *NtWAK2a*、*NtWAK2b*、*NtWAK2c* 與 *NtWAK2d* 等蛋白質結構由 N 端開始包含 Signal peptide (SP)、WAK-GUB 域 (Pfam 編號：PF13947)、EGF-like 域 (SMART 編號：SM000181)、跨膜域與蛋白激酶域 (Pfam 編號：PF00069)，屬於典型 *WAK* 蛋白的結構 (附圖一)；*NtWAK2ex1* 與 *NtWAK2ex2* 缺少 SP 和 WAK-GUB 域，而 *NtWAK2f* 與 *NtWAK2g* 則缺少 SP (附圖一)。支序群 II 中，包含 7 個 *AtWAKLs* 與 *N. tabacum* 基因 107814201

(定名為 *NtWAKL1a*)，此支序群的蛋白序列大多缺少 EGF-like 域或 EGF-Ca²⁺域，且部分 WAKLs 具有其他支序群的蛋白序列沒有的 WAK-associated 域 (Pfam 編號：PF08488)(圖一)。觀察支序群 I 與 II 序列於親緣樹的分布，可發現同科植物的基因大部分集中於同一支序，顯示支序群 I 與 II 中各科植物的基因應多為植物科內自行演化的結果 (圖一)。

支序群 III 中包含 *N. tabacum* 基因 107771892、107811265 (定名為 *NtWAKL20a* 與 *NtWAKL20b*) 以及 107806264 的兩個 isoform (定名為 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2*) (圖一)。*NtWAKL20a* 與 *NtWAKL20b* 缺少 EGF-like 與 EGF-Ca²⁺域，*NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 缺少 WAK-GUB 域 (附圖一)。觀察支序群 III 之序列於親緣樹的分布，發現單子葉植物的水稻與雙子葉各科植物的序列大多呈交錯出現，說明支序群 III 中各科植物的基因可能多傳承自單子葉與雙子葉植物種化前的共同祖先 (圖一)。

2. OPEL 重組蛋白之純化與蛋白引發植物防禦反應的活性

本研究利用大腸桿菌表現 OPEL-GST 融合蛋白，經 GST 親和管柱純化後，加入 thrombin 與 OPEL-GST 反應以切除 GST tag，再利用凝膠過濾層析單獨分離出 OPEL 重組蛋白。將分管連續收集的流洗液以 SDS-PAGE 分析，可看見分子量約 70 kDa 之 OPEL 重組蛋白條帶 (圖二)。將 2 μM OPEL 重組蛋白 (或以 MES buffer 作為控制組) 浸潤於五週大之 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN)，兩天後收取葉片，褪除葉片色素並以苯胺藍 (aniline blue) 染色 (圖三 A)，定量結果顯示 OPEL 處理組之癒傷葡聚糖數量明顯多於控制組 (圖三 B)，顯示純化之 OPEL 重組蛋白具有引發植物防禦反應的活性。



3. *NtWAKs* 與 *NtWAKLs* 之表現量受 OPEL 誘導

為確認前述 *NtWAKs* 與 *NtWAKLs* 基因確實能受 OPEL 誘導表現，於處理 OPEL 重組蛋白後不同時間點收取 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片，抽取 total RNAs，並進行 qRT-PCR 分析。由於 *NtWAK2ex1*、*NtWAK2ex2*、*NtWAK2f* 以及 *NtWAK2g* 缺少 SP，本研究未將其納入探討；另外，因未能設計出理想的 *NtWAK2d* 專一性引子對，該基因也不在分析之列。

NtWAKL14x1 與 *NtWAKL14x2* 的核酸序列相同度相當高，為設計專一性偵測兩基因表現量的引子對，使 *NtWAKL14x1* 上游引子(264x1_qF)黏合於該基因的 5'-UTR 區域，而 *NtWAKL14x2* 的上游引子(264x2_qF)則黏合於該基因的 open reading frame (ORF) 區域 (附圖二)。分析結果顯示，基因 *NtWAK2a*、*NtWAKL1a*、*NtWAKL20a* 與 *NtWAKL20b* 在 OPEL 重組蛋白處理後 6 小時內的表現量未有明顯變化，但於處理後 12 小時明顯提升 (圖四)；而基因 *NtWAK2b*、*NtWAK2c*、*NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 之表現量在 OPEL 重組蛋白處理後 6 小時的表現量便提升，並於處理後 12 小時達到偵測時間內之峰值 (圖四)。

4. 疫病菌感染誘導 *NtWAKs* 與 *NtWAKLs* 候選基因表現

為瞭解各 *NtWAKs* 與 *NtWAKLs* 候選基因是否參與植物受 *P. parasitica* 侵染時引發之反應，以噴灑 *P. parasitica* 游走孢子懸浮液 (10^4 - 10^5 spores/mL) 進行 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 全株接種 (以無菌水作為控制組)，並於接種後 0、12、24、48 與 72 小時分別收取接種葉片抽取 RNA 以進行 qRT-PCR 分析。

因候選基因數量多，自 OPEL 處理後 6 小時後表現量提升的基因中挑選 *NtWAK2b*、*NtWAK2c* 與 *NtWAKL14x1*，並由 OPEL 處理 12 小時後提升的基因中挑選 *NtWAK2a* 與 *NtWAKL20b* 作為分析對象。

分析結果顯示，*NtWAK2a*、*NtWAK2c* 及 *NtWAKL14x1* 的表現量於疫病菌接種後被誘導表現，且於接種後 72 小時表現量達到最高點，而 *NtWAK2b* 與 *NtWAKL20b* 的表現量在測量時間範圍內未有明顯變化 (圖五)。



5. *NtWAKL14x1*-GFP 分布於植物細胞膜

NtWAK2a、*NtWAK2c* 與 *NtWAKL14x1* 三個基因無論因應 OPEL 重組蛋白處理或疫病菌接種皆可被誘導表現，具有深入探討的價值。然而，因未成功製得 *NtWAK2a* 與 *NtWAK2c* 的暫表現農桿菌菌株，後續僅以 *NtWAKL14x1* 作為研究標的。為瞭解 *NtWAKL14x1* 蛋白於細胞內之分布位置，於 4.5 週大之圓葉菸草葉片共同表現 *NtWAKL14x1*-GFP 與細胞膜標誌蛋白 *AtACA8*-mCherry，利用雷射共軛焦顯微鏡觀察，發現 *NtWAKL14x1*-GFP 的分布幾乎與 *AtACA8*-mCherry 完全疊合 (圖六 A)；進一步利用 ImageJ 將兩種螢光影像疊合並將螢光訊號量化進行分析，也發現 *NtWAKL14x1*-GFP 之分布幾乎與 *AtACA8*-mCherry 完全疊合 (圖六 B)。另外，也於 4.5 週大之圓葉菸草葉片共同表現 *NtWAKL14x1*-GFP 與細胞內質網標誌蛋白 mCherry-KDEL，以雷射共軛焦顯微鏡觀察，發現不論取自表皮細胞中心或周邊(periphery)的影像都顯示 *NtWAKL14x1*-GFP 與 mCherry-KDEL 在細胞內的分布位置不同 (圖六 C)。利用 ImageJ 將細胞中心剖面之兩種螢光影像疊合，並進行螢光訊號量化分析，發現兩種螢光訊號之位置雖相近，但峰值之距離相差約 1 μm (圖六 D)。這些結果指出 *NtWAKL14x1*-GFP 分布於植物細胞膜，而不是內質網。

6. 植物生長與表觀不受 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 靜默之影響

為瞭解 *NtWAKL14x1* 的作用，參照賴 (2022) 所建立之 CMV 介導基因靜默 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 系統，靜默 *NtWAKL14x1* 的基因表現。然而，序列分析顯示 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 的核酸序列相同度很高，無法針對單一基因設計專一性靜默片段 (附圖二)，因此建構可同時靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2*

的質體 pJLCMV20-*NtWAKL14*，並使用插入部分 35S promoter 序列片段之 pJLCMV20-35S (Tzean et al. 2019) 作為控制組。

為確認靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 是否影響植株生長，以農桿菌浸潤 18 天大的 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 的第一片真葉後 17 天，觀察植株外觀並測試基因靜默效率。整體而言，*NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 靜默植株 (*siNtWAKL14*) 與控制組 (35S) 植株不論在生長速度或表觀都無明顯差異 (圖七)。至於基因靜默效率，*NtWAKL14x1* 介於 30-50%，而 *NtWAKL14x2* 介於 50-70% 之間 (圖八 A、圖九 A 與圖十 A)。

7. 同時靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 降低 OPEL 引發植物基礎防禦反應的能力

為探討 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 在 OPEL 引發植物防禦反應的角色，本研究靜默兩者在 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 植株的表現，並分析基因靜默對於 OPEL 引發之癒傷葡聚糖沉積量與細胞死亡的影響。利用 qRT-PCR 測試基因表現量，確認靜默之成效 (圖八 A)。苯胺藍染色分析結果發現，相較於施打 CMV::35S 的植株，OPEL 於 *siNtWAKL14* 植株引發的癒傷葡聚糖沉積量顯著減少 (圖八，B 與 C)。顯示靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 會降低 OPEL 引發癒傷葡聚糖沉積的能力。

此外，也分析基因靜默對於 OPEL 引發之細胞死亡的影響。以 qRT-PCR 測試基因表現量，確認靜默之成效 (圖九 A)。浸潤 OPEL 重組蛋白兩天後在 CMV::35S 處理葉片造成嚴重水浸狀病徵，應為細胞死亡的前兆；相對的，在 *siNtWAKL14* 植株僅導致輕微的病徵 (圖九 B)。透過測量葉片細胞之離子滲漏的方式量化細胞死亡程度，結果顯示處理 OPEL 重組蛋白後，CMV::35S 處理葉片的細胞死亡程度明顯比 *siNtWAKL14* 葉片嚴重 (圖九 C)，表示靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 會降低 OPEL 引發植物細胞死亡的能力。

8. 同時靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 降低 *N. tabacum* 對疫病菌之抗性

為瞭解 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 是否涉及植物對疫病菌的抗性，對 35S 與 *siNtWAKL14* 植株以 *P. parasitica* 游走子懸浮液進行離葉接種。利用 qRT-PCR 測試基因表現量，確認靜默之成效 (圖十 A)。接種 48 小時後拍照觀察，發現相較於控制組，疫病菌在 *siNtWAKL14* 之葉片上產生的病斑面積較大 (圖十 B 與 C)，說明靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 會減弱 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 對疫病菌之抗性。



1. CMV 介導基因靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2*

多數 *N. tabacum* 栽培種帶有 N gene，該基因致使植物對 tobacco mosaic virus (TMV) 等病毒啟動過敏性反應 (Dunigan et al. 2007)，導致 *N. tabacum* 的 VIGS 實驗系統發展困難。長期以來研究 *N. tabacum* 基因功能時，常需以同為菸草屬的模式植物圓葉菸草作為替代 (Liu et al. 2002; Peart et al. 2002)。然而，圓葉菸草與 *N. tabacum* 在形態、生理等方面存在差異，例如將 OPEL 重組蛋白施打於 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片可造成明顯之細胞死亡，卻無法於圓葉菸草葉片觀察到類似現象 (Chang et al. 2015)，因此仍有建立 *N. tabacum* 基因靜默系統之必要。

Zhang et al. (2013) 應用 tobacco rattle virus (TRV) 介導基因靜默系統在 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 靜默 *PDS* 基因，發現靜默株外觀產生明顯白化，但生長也嚴重受阻。賴 (2022) 則曾利用 TRV-VIGS 系統，對 2.5-3 週大之 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 子葉施打帶有 TRV1 及 TRV2::*GFP* 或 TRV2::*PDS* 的農桿菌，然而兩種處理之植株皆無法正常生長，且沿葉脈出現壞疽病徵。賴 (2022) 因此改借用 Tzean et al. (2019) 開發之 cucumber mosaic virus (CMV) 載體，在 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 成功建立 CMV 介導基因靜默系統。

本研究沿用上述 CMV 介導之基因靜默系統靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2*。設計 VIGS 載體時，利用 VIGS tool (SGN 資料庫) 分析兩基因之全長序列，得到預測分數最高的三個片段。實際透過農桿菌浸潤法將 CMV-VIGS 載體打入 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 子葉，觀察到病毒病徵輕微，植株仍可正常生長。然而其中兩個載體的靜默效率並不理想 (data not shown)，第三個載體 (其使用的基因片段如附圖二所示) 之靜默成效相對穩定，雖然靜默效率大多無法高於五成，靜默植株於防禦反應等方面皆展現出與控制組的顯著差異。因此應用於本研究探討 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 之功能。未來若能藉由調整植株培植溫度與篩選其他合適之 CMV 病毒株等方式改善靜默效率，將有助於讓此基因靜默系統發揮更大的應用潛力。



2. *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 在 OPEL 引發防禦反應的角色

目前關於 *NtWAKL14* 與 *NtWAKL14x2* 在其他植物中的同源基因，有以下研究報導：當阿拉伯芥暴露在含鋅 (Zn)、鎳 (Ni) 或銅 (Cu) 等重金屬環境中，會誘使根尖組織表現 *AtWAKL14* (Roshandel 2007)，顯示阿拉伯芥 *AtWAKL14* 可能參與植物面臨非生物性逆境時的反應；在馬鈴薯遭馬鈴薯包囊線蟲 (*Globodera rostochiensis*) 侵入的植株部位，*StWAKL2* 基因表現量顯著下調，顯示該基因可能參與植物—線蟲交互作用 (Chen et al. 2022)。儘管目前對 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 在其他植物中的同源性基因瞭解相當有限，但前述文獻內容顯示這類基因可能與植物遭遇逆境時的反應有關，瞭解這些基因的特性與功能應有助重要作物之抗性研發。

本研究透過暫表現 *NtWAKL14x1*-GFP，發現該蛋白位於植物細胞膜，符合一般對 WAK 與 WAKL 的認知。雖未進行 *NtWAKL14x2* 暫表現實驗，但 *NtWAKL14x2* 與 *NtWAKL14x1* 蛋白質結構域組成相同 (附圖一)，且序列僅於 SP 處相差數個胺基酸 (附圖三)，因此推測兩者很可能表現於細胞的相同位置。

以 OPEL 處理 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 可引發 ROS 累積、癒傷葡聚糖沉積、細胞死亡與誘導 SA、PTI 相關基因表現 (Chang et al. 2015)。本研究發現靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 會降低 OPEL 引發癒傷葡聚糖沉積與細胞死亡等植物防禦反應的能力，並且加速疫病菌 *P. parasitica* 感染，顯示 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 在 OPEL 引發防禦反應以及植物對疫病菌的抗性扮演正向調控的角色。值得強調的是，這是第一個 WAKL 基因參與植物對疫病菌抗性的紀錄。

另外，靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 並不會影響植株的營養生長階段，但鑒於有水稻 *OsWAK91* 等專司生殖生長基因的研究報導 (Wang et al. 2012)，推測 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 仍有參與生殖生長調控的可能，但本研究並未針對該階段進行觀察。並且，若菸草具有功能與兩者互補的基因，也可能導致基因靜默植

株表觀無變化。欲探究 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 是否與植物生長有關，需更多研究探討。

本研究並未分析靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 對 OPEL 引發 ROS 累積的影響，主要是因以 luminol-based 化學冷光法無法有效偵測 OPEL 重組蛋白在 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 引發之 ROS 累積 (賴, 2022)。另外，CMV-VIGS 葉片注射 OPEL 重組蛋白區域的葉綠素不易褪除，因此也不易以 diaminobenzidine (DAB) 染色法呈現 H₂O₂ 累積情形。

關於 OPEL 引發植物辨識的機制，目前有以下探討：Chang et al. (2015) 發現將 OPEL 的 β -1,3-glucanase 酵素活性位點突變會減弱其引發 ROS 累積與癒傷葡聚醣沉積等能力；收集預處理 OPEL 重組蛋白之 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片的質外體液 AF 並打回 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片，可引發細胞死亡，推測 AF 可能含有 OPEL 分解植物組成產生的 DAMPs (楊, 2020)。然而酵素活性位點突變僅讓 OPEL 引發防禦反應的能力減弱而非完全消失，因此無法排除 OPEL 作為蛋白 PAMP 被菸草辨識的可能性 (楊, 2020)。賴 (2022) 嘗試透過基因靜默 *NtLYM2* 與 *NtBAK1* 探討 OPEL 作用所涉及的辨識路徑，發現靜默 *NtLYM2* 或 *NtBAK1* 皆無法全面影響 OPEL 引發的植物反應：靜默 *NtLYM2* 僅減少 OPEL 引發之癒傷葡聚醣累積，靜默 *NtBAK1* 僅減緩 OPEL 引發之植物細胞離子滲漏，由此推測 OPEL 之作用機制可能涉及多種活性物質及植物辨識路徑。

本研究分析 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 蛋白結構，發現兩者皆缺少能與果膠或 OGs 等受質結合的 WAK-GUB 結構域 (Brutus et al. 2010; Kohorn et al. 2006)。因此推想 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 較不可能透過直接辨識受質的方式參與防禦反應。鑒於棉花 GhWAK7A 透過與幾丁質受體 CERK1 以及 LYK5 結合，於受體辨認到幾丁質時協助引發防禦反應的例子 (Wang et al. 2020)，初步假設 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 有可能作為輔受體，協助某個未知但可辨識 OPEL 相關活性物質的受體引發植物防禦反應。未來可朝向尋找是否有與 *NtWAKL14x1*

或 *NtWAKL14x2* 具交互作用的植物蛋白，使 OPEL 作用機制與菸草 *WAKL* 基因功能的探究更加完整。



3. *WAK2*-like 基因在植物防禦反應中的角色

除了 *NtWAKL14x1*，*NtWAK2a* 與 *NtWAK2c* 的基因表現量也可受 OPEL 重組蛋白處理或疫病菌接種誘導，且 *NtWAK2a* 與 *NtWAK2c* 表現量提升的倍數皆比 *NtWAKL14x1* 大 (圖四、圖五)。其中 *NtWAK2c* 與 *NtWAKL14x1* 同樣於 OPEL 重組蛋白處理後 6 小時內表現量便顯著提升，和 Chang et al. (2015)偵測到 OPEL 誘發 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) SA 與 PTI 相關基因表現的時間點相近，因此 *NtWAK2c* 也可能是參與 OPEL 引發植物防禦反應的候選基因。

根據親緣分析結果，*NtWAK2c* 和阿拉伯芥 *AtWAKs* 關係相近 (圖一)。*AtWAK1* 與 *AtWAK2* 可與果膠結合，調控植物細胞生長 (Kohorn et al. 2006; Kohorn et al. 2009)。*AtWAK1* 也能辨識由細胞壁果膠分解後產生的 OGs 引發防禦反應 (Brutus et al. 2010)；另有研究指出，可於表現 *AtWAK2* 顯性等位基因的植株 *WAK2cTAP* 觀察到 ROS 累積與防禦相關基因表現增加的情形 (Kohorn et al. 2012)。近年被發現可作為輔受體協助 PRRs 啟動防禦反應的番茄 *SlWAK1* (Solyc09g014720.1.1) 與 *GhWAK7A* (A02G083300.1，未列在圖一，但與 A02G007310.1 序列完全相同) 也和 *NtWAK2a* 與 *NtWAK2c* 同屬於支序群 I (圖一)。根據上述例子，*NtWAK2a* 與 *NtWAK2c* 也可能參與植物生長或防禦相關反應。

本研究雖未針對 *NtWAK2a* 與 *NtWAK2c* 進行功能性探討，但兩基因在 OPEL 引發之防禦反應中扮演的角色也相當值得探究。

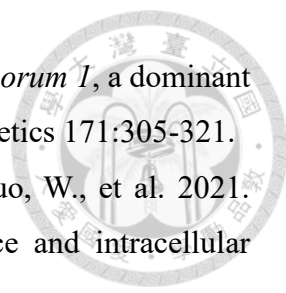
4. 結語


為瞭解表現受 OPEL 誘導的 *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) *WAKL* 基因 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 如何影響 OPEL 引發之植物防禦反應，本研究利用 Tzean et al. (2019) 開發的 CMV 介導基因靜默系統對其進行基因靜默，發現靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 會降低 OPEL 引發癒傷葡聚糖沉積與細胞離子滲漏的能力，且會降低 *N. tabacum* 對疫病菌的抗性，為首個 *WAKL* 基因參與植物對卵菌抗性的紀錄。關於 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 參與 OPEL 作用的詳細機制尚待更多研究探討。

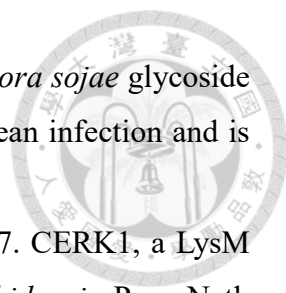
引用文獻

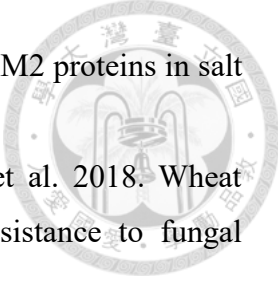


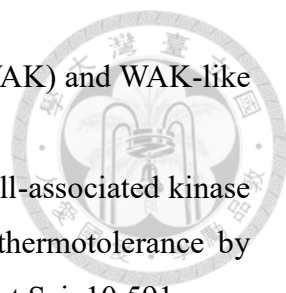
- 柯岱妤 (2019)。探討疫病菌質外體效應蛋白 OPEL 對於菸草轉錄體的影響。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文，台北市。
- 陳佳君 (2019)。探討疫病菌 OPEL 同源性基因在植物基礎防禦反應的角色。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文，台北市。
- 楊雅媛 (2020)。探討疫病菌質外體效應蛋白 OPEL 如何引發植物免疫反應。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文，台北市。
- 賴沛宜 (2022)。探討 OPEL 引發植物免疫反應之機制。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文，台北市。
- BEN-DANIEL, B. H., Bar-Zvi, D., and TSROR, L. 2012. Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene-disrupted and gene-overexpressing mutant lines. *Mol. Plant Pathol.* 13:187-197.
- Boller, T., and He, S. Y. 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324:742-744.
- Boutrot, F., and Zipfel, C. 2017. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55:257-286.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G. 2010. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:9452-9457.
- Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C. T., Jedrzejczak, R. P., et al. 2014. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *elife* 3:e03766. Doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.03766>
- Chang, Y. H., Yan, H. Z., and Liou, R. F. 2015. A novel elicitor protein from *Phytophthora parasitica* induces plant basal immunity and systemic acquired resistance. *Mol. Plant Pathol.* 16:123-136.
- Chen, S., Cui, L., and Wang, X. 2022. A plant cell wall-associated kinase encoding gene is dramatically downregulated during nematode infection of potato. *Plant Signal. Behav.* 17:2004026.

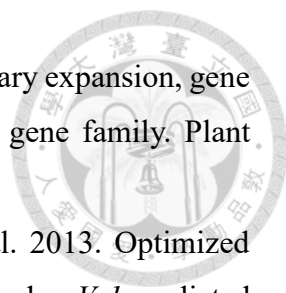
- 
- Diener, A. C., and Ausubel, F. M. 2005. Resistance to *fusarium oxysporum* I, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* 171:305-321.
- Ding, P., Sakai, T., Krishna Shrestha, R., Manosalva Perez, N., Guo, W., et al. 2021. Chromatin accessibility landscapes activated by cell-surface and intracellular immune receptors. *J. Exp. Bot.* 72:7927-7941.
- Dunigan, D. D., Golemboski, D. B., and Zaitlin, M. 2007. Analysis of the N gene of *Nicotiana*. Pages 120-135 in: Ciba Foundation Symposium 133-Plant Resistance to Virus: Plant Resistance to Virus: Ciba Foundation Symposium 133 Wiley Online Library.
- Faris, J. D., and Friesen, T. L. 2020. Plant genes hijacked by necrotrophic fungal pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 56:74-80.
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H., Handsaker, R. E., et al. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461:393-398.
- Hansen, E. M. 2015. *Phytophthora* species emerging as pathogens of forest trees. *Curr. For. Rep.* 1:16-24.
- Hatsugai, N., and Katagiri, F. 2018. Quantification of plant cell death by electrolyte leakage assay. *Bio-protocol* 8:e2758-e2758.
- He, Z.-H., Fujiki, M., and Kohorn, B. D. 1996. A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271:19789-19793.
- Hu, K., Cao, J., Zhang, J., Xia, F., Ke, Y., et al. 2017. Improvement of multiple agronomic traits by a disease resistance gene via cell wall reinforcement. *Nat. Plants* 3:1-9.
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kameshwar, A. K. S., Ramos, L. P., and Qin, W. 2019. CAZymes-based Ranking of Fungi (CBRF): an interactive web database for identifying fungi with extrinsic plant biomass degrading abilities. *Bioresour. Bioprocess.* 6:1-10.
- Kanneganti, V., and Gupta, A. K. 2011. RNAi mediated silencing of a wall associated kinase, OsiWAK1 in *Oryza sativa* results in impaired root development and sterility due to anther indehiscence. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17:65-77.
- Kohorn, B. D., and Kohorn, S. L. 2012. The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front. Plant Sci.* 3:88.
- Kohorn, B. D., Kohorn, S. L., Todorova, T., Baptiste, G., Stansky, K., et al. 2012. A dominant allele of *Arabidopsis* pectin-binding wall-associated kinase induces a

- 
- stress response suppressed by *mpk6* but not *mpk3* mutations. *Mol Plant*. 5:841-851.
- Kohorn, B. D., Johansen, S., Shishido, A., Todorova, T., Martinez, R., et al. 2009. Pectin activation of map kinase and gene expression is WAK2 dependent. *Plant J*. 60:974-982.
- Kohorn, B. D., Kobayashi, M., Johansen, S., Riese, J., Huang, L. F., et al. 2006. An *Arabidopsis* cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. *Plant J*. 46:307-316.
- Kruijt, M., Brandwagt, B. F., and De Wit, P. J. 2004. Rearrangements in the *Cf-9* disease resistance gene cluster of wild tomato have resulted in three genes that mediate Avr9 responsiveness. *Genetics* 168:1655-1663.
- Larkan, N. J., Ma, L., Haddadi, P., Buchwaldt, M., Parkin, I. A., et al. 2020. The *Brassica napus* wall-associated kinase-like (WAKL) gene *Rlm9* provides race-specific blackleg resistance. *Plant J*. 104:892-900.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P. J., and Govers, F. 2003. Oomycetes and fungi: Similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiol*. 11:462-469.
- Laugé, R., Goodwin, P. H., De Wit, P. J., and Joosten, M. H. 2000. Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *Plant J*. 23:735-745.
- Li, Q., Hu, A., Qi, J., Dou, W., Qin, X., et al. 2020. CsWAKL08, a pathogen-induced wall-associated receptor-like kinase in sweet orange, confers resistance to citrus bacterial canker via ROS control and JA signaling. *Hortic. Res*. 7:42.
- Liebrand, T. W., van den Berg, G. C., Zhang, Z., Smit, P., Cordewener, J. H., et al. 2013. Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110:10010-10015.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., and Dinesh-Kumar, S. 2002. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPRI/NIMI* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*. 30:415-429.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 42:D490-D495.

- 
- Ma, Z., Song, T., Zhu, L., Ye, W., Wang, Y., et al. 2015. A *Phytophthora sojae* glycoside hydrolase 12 protein is a major virulence factor during soybean infection and is recognized as a PAMP. *Plant Cell* 27:2057-2072.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., et al. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:19613-19618.
- Morales-Cruz, A., Amrine, K. C., Blanco-Ulate, B., Lawrence, D. P., Travadon, R., et al. 2015. Distinctive expansion of gene families associated with plant cell wall degradation, secondary metabolism, and nutrient uptake in the genomes of grapevine trunk pathogens. *BMC Genet.* 16:1-22.
- Muchero, W., Sondreli, K. L., Chen, J.-G., Urbanowicz, B. R., Zhang, J., et al. 2018. Association mapping, transcriptomics, and transient expression identify candidate genes mediating plant–pathogen interactions in a tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 115:11573-11578.
- Nühse, T. S. 2012. Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Front. Plant Sci.* 3:280.
- Naveed, Z. A., Wei, X., Chen, J., Mubeen, H., and Ali, G. S. 2020. The PTI to ETI continuum in *Phytophthora*-plant interactions. *Front. Plant Sci.* 11:593905.
- Ngou, B. P. M., Ahn, H.-K., Ding, P., and Jones, J. D. 2021. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* 592:110-115.
- Ngou, B. P. M., Ding, P., and Jones, J. D. G. 2022. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *Plant Cell* 34:1447-1478.
- Pérez-Hernández, A., González, M., González, C., van Kan, J. A., and Brito, N. 2017. BcSUN1, a *B. cinerea* SUN-family protein, is involved in virulence. *Front. Microbiol.* 8:35.
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., et al. 2015. Fungal cellulases. *Chem. Rev.* 115:1308-1448.
- Peart, J. R., Cook, G., Feys, B. J., Parker, J. E., and Baulcombe, D. C. 2002. An *EDS1* orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J.* 29:569-579.
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., et al. 2009. DOG 1.0: Illustrator of protein domain structures. *Cell Res.* 19:271-273.

- 
- Roshandel, P. 2007. The possible involvement of MYB, WAK and RIM2 proteins in salt tolerance in rice. *Indian J. Plant Physiol* 12:215.
- Saintenac, C., Lee, W.-S., Cambon, F., Rudd, J. J., King, R. C., et al. 2018. Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nat. Genet.* 50:368-374.
- Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z.-H., Tong, H., Osawa, H., et al. 2003. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132:2256-2266.
- Stergiopoulos, I., van den Burg, H. A., Ökmen, B., Beenen, H. G., van Liere, S., et al. 2010. Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:7610-7615.
- Tan, X., Hu, Y., Jia, Y., Hou, X., Xu, Q., et al. 2020. A conserved glycoside hydrolase family 7 cellobiohydrolase PsGH7a of *Phytophthora sojae* is required for full virulence on soybean. *Front. Microbiol.* 11:1285.
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38:3022-3027.
- Thomas, C. M., Jones, D. A., Parniske, M., Harrison, K., Balint-Kurti, P. J., et al. 1997. Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognition specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. *Plant Cell* 9:2209-2224.
- Thomma, B. P., Nürnberger, T., and Joosten, M. H. 2011. Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant cell* 23:4-15.
- Tzean, Y., Lee, M.-C., Jan, H.-H., Chiu, Y.-S., Tu, T.-C., et al. 2019. Cucumber mosaic virus-induced gene silencing in banana. *Sci. Rep.* 9:1-9.
- van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H., Vervoort, J., and de Wit, P. J. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:1420-1430.
- van den Burg, H. A., Westerink, N., Francoijs, K.-J., Roth, R., Woestenenk, E., et al. 2003. Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *J. Biol. Chem.* 278:27340-27346.

- 
- Verica, J. A., and He, Z.-H. 2002. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiol.* 129:455-459.
- Wang, H., Niu, H., Liang, M., Zhai, Y., Huang, W., et al. 2019. A wall-associated kinase gene *CaWAKL20* from pepper negatively modulates plant thermotolerance by reducing the expression of ABA-responsive genes. *Front. Plant Sci.* 10:591.
- Wang, N., Huang, H.-J., Ren, S.-T., Li, J.-J., Sun, Y., et al. 2012. The rice wall-associated receptor-like kinase gene *OsDEESI* plays a role in female gametophyte development. *Plant Physiol.* 160:696-707.
- Wang, P., Zhou, L., Jamieson, P., Zhang, L., Zhao, Z., et al. 2020. The cotton wall-associated kinase GhWAK7A mediates responses to fungal wilt pathogens by complexing with the chitin sensory receptors. *Plant Cell* 32:3978-4001.
- Werner, S., Steiner, U., Becher, R., Kortekamp, A., Zyprian, E., et al. 2002. Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208:169-173.
- Willmann, R., Lajunen, H. M., Erbs, G., Newman, M.-A., Kolb, D., et al. 2011. *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:19824-19829.
- Xia, X., Zhang, X., Zhang, Y., Wang, L., An, Q., et al. 2022. Characterization of the *WAK* gene family reveals genes for FHB resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 23:7157.
- Xia, Y., Yin, S., Zhang, K., Shi, X., Lian, C., et al. 2018. OsWAK11, a rice wall-associated kinase, regulates Cu detoxification by alteration the immobilization of Cu in cell walls. *Environ. Exp. Bot.* 150:99-105.
- Yang, Y., Zhang, Y., Li, B., Yang, X., Dong, Y., et al. 2018. A *Verticillium dahliae* pectate lyase induces plant immune responses and contributes to virulence. *Front. Plant Sci.* 9:1271.
- Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., et al. 2021. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* 592:105-109.
- Zhang, N., Pombo, M. A., Rosli, H. G., and Martin, G. B. 2020. Tomato wall-associated kinase SIWAK1 depends on FLS2/FLS3 to promote apoplastic immune responses to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol.* 183:1869-1882.

- 
- Zhang, S., Chen, C., Li, L., Meng, L., Singh, J., et al. 2005. Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice wall-associated kinase gene family. *Plant Physiol.* 139:1107-1124.
- Zhang, Z., Fradin, E., de Jonge, R., van Esse, H. P., Smit, P., et al. 2013. Optimized agroinfiltration and virus-induced gene silencing to study *Vel*-mediated *Verticillium* resistance in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:182-190.
- Zhang, Z., Ma, W., Ren, Z., Wang, X., Zhao, J., et al. 2021. Characterization and expression analysis of wall-associated kinase (WAK) and WAK-like family in cotton. *Int. J. Biol. Macromol.* 187:867-879.
- Zhou, J.-M., and Zhang, Y. 2020. Plant immunity: danger perception and signaling. *Cell* 181:978-989.

附表



表一、本研究使用的引子對

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study.

Name	Sequence (5' to 3')	Target gene
For qRT-PCR		
498_qF	ATA GCC AAG GCT GGT CAA CT	<i>NtWAK2a</i> (LOC107771498)
498_qR	TGG AAG AAA CAT AGG GAT GGG G	
033_qF	ACT CCA ACA CAA ATA GCA GCA AC	<i>NtWAK2b</i> (LOC107776033)
033_qR	GAG AAG GAA AGA ACG TAC AAC TGC	
571_qF	ATC TGT GAA CTA CAC CGC GA	<i>NtWAK2c</i> (LOC107830571)
571_qR	CTG GCA ACA ACC AAC ACC AG	
201_qF	TTG GAT GGC TAC GCC ACT AGA	<i>NtWAKL1a</i> (LOC107814201)
201_qR	TCT TAG GCC GGC AAT TCT CT	
892_qF	GTT ATG CGC CCA AGA TGT G	<i>NtWAKL20a</i> (LOC107771892)
892_qR	TGG GCA TCC TTA ATT CGC TTG	
265_qF	GGC ACT TGG TTT TCT GGC TG	<i>NtWAKL20b</i> (LOC107811265)
265_qR	GCA GCA ATA CTG ATT TTG TTC ATG C	
264x1_qF	AGA GCA AGA AAG AGA GGG GG	<i>NtWAKL14x1</i> (LOC107806264 isoform X1)
264x1_qR	CAG TTG AGG ATG GTG GGA AGT	
264x2_qF	CCA GTC CCA CGA TTC GTC TT	<i>NtWAKL14x2</i> (LOC107806264 isoform X2)
264x2_qR	GGA ACA CGC TGG CCA TTA GA	
For protein overexpression plasmid construct		
264x1_oeF	CAC CAT GGT TTT TGA TGA AAC A	<i>NtWAKL14x1</i> (LOC107806264 isoform X1)
264x1_oeR	TCG ACC AGC ACT ACC CAG TAA TC	
For VIGS plasmid construct		
264_sF	TTG GAG GGA TTA TTG CTG GAG CTG	<i>NtWAKL14x1</i> and <i>NtWAKL14x2</i> (LOC107806264 isoform X1 and X2)
264_sR	TCA ACG CCA TCT GGA TCT CGA TGT	

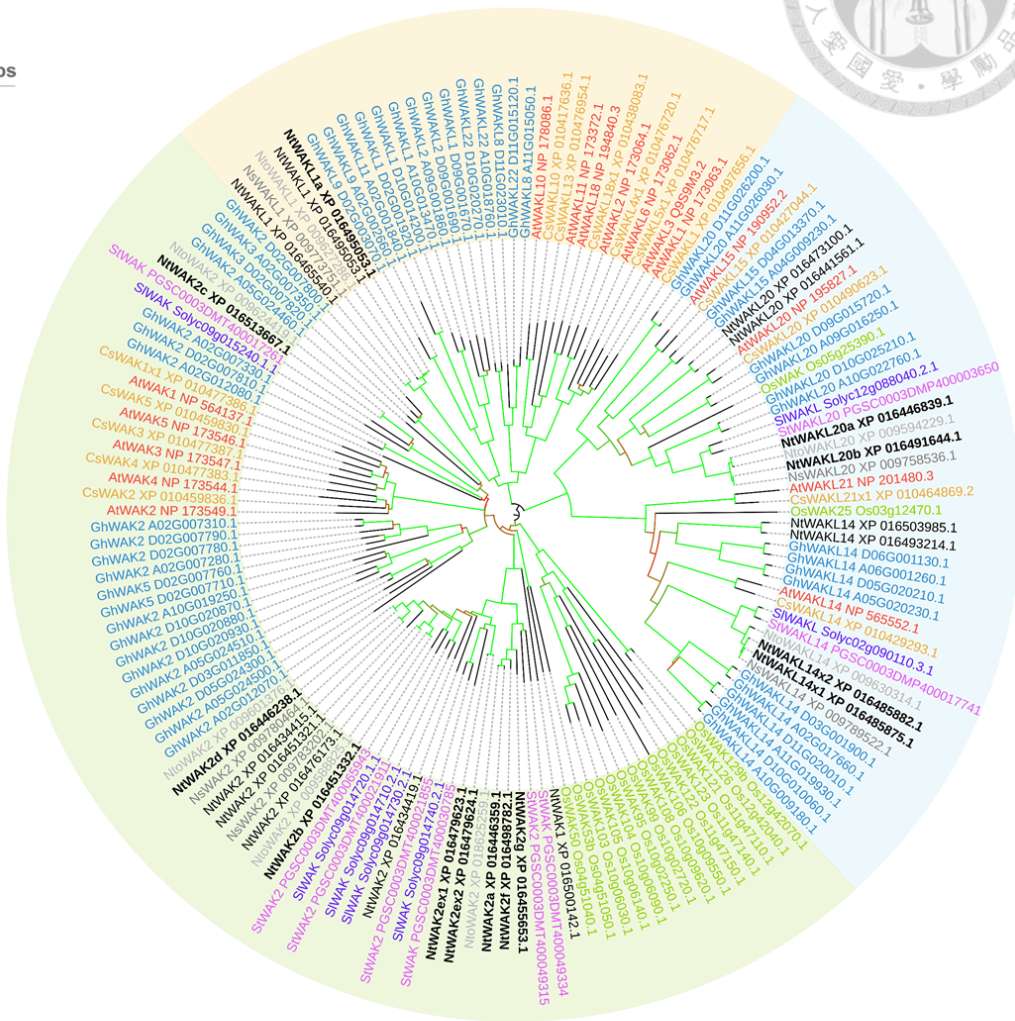
附圖



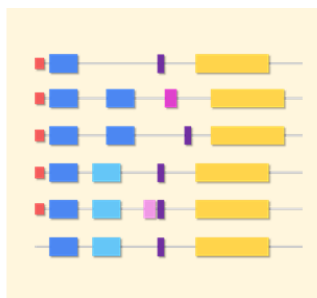
Gene groups



Bootstrap



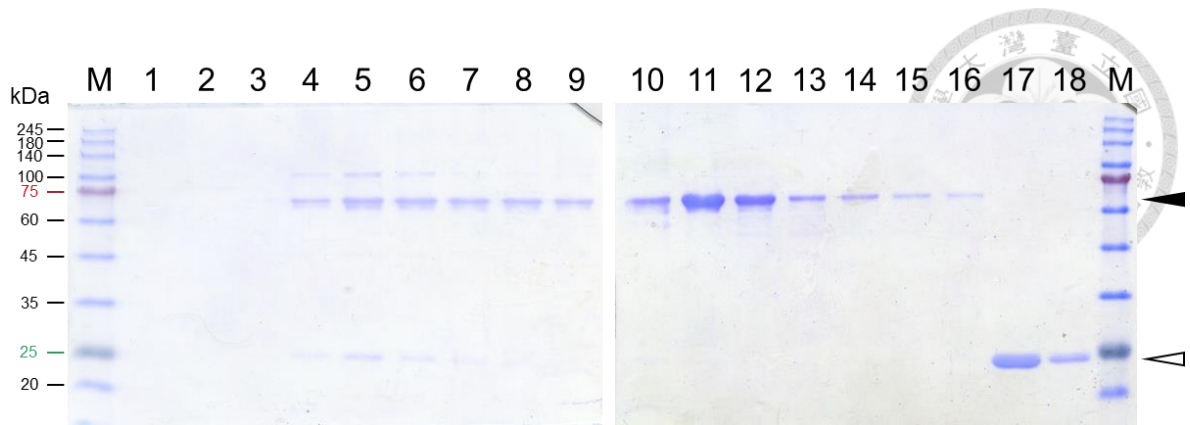
Tree scale: 1



圖一、NtWAKs 及其同源性基因之親緣關係分析與蛋白結構預測

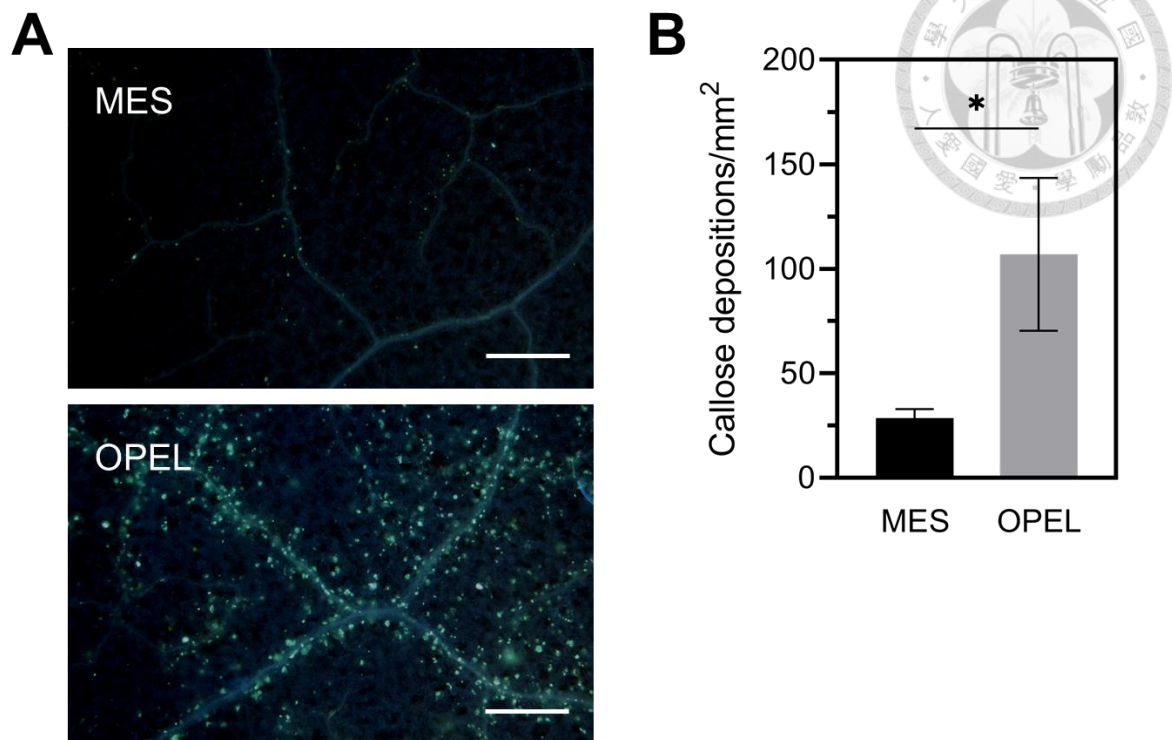
Fig 1. Phylogenetic analysis and domain structure prediction of NtWAKs and their

homologs. Phylogenetic tree of NtWAKs and their homologs. Protein sequences of wall-associated kinase (WAK) and wall-associated kinase-like (WAKL) were retrieved from National Center for Biotechnology Information (NCBI), Sol Genomics Network (SGN), Cotton Functional Genomics Database (CottonFGD) and Rice Genome Annotation Project (RGAP), encompassing those from *Arabidopsis thaliana*, *Camelina sativa*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Gossypium hirsutum* and *Oryza sativa*, as indicated in the figure with different colors. After sequence alignment by using MAFFT version 7, the phylogenetic tree was generated by using the neighbor-joining algorithm and statistical significance was evaluated by using bootstrap with 1,000 pseudoreplicates. Representative patterns of protein domains in group I, II and III are placed in blocks of mist green, mist yellow, and mist blue, respectively. Conserved protein domains were predicted by using InterProScan, SMART and SignalP 6.0.



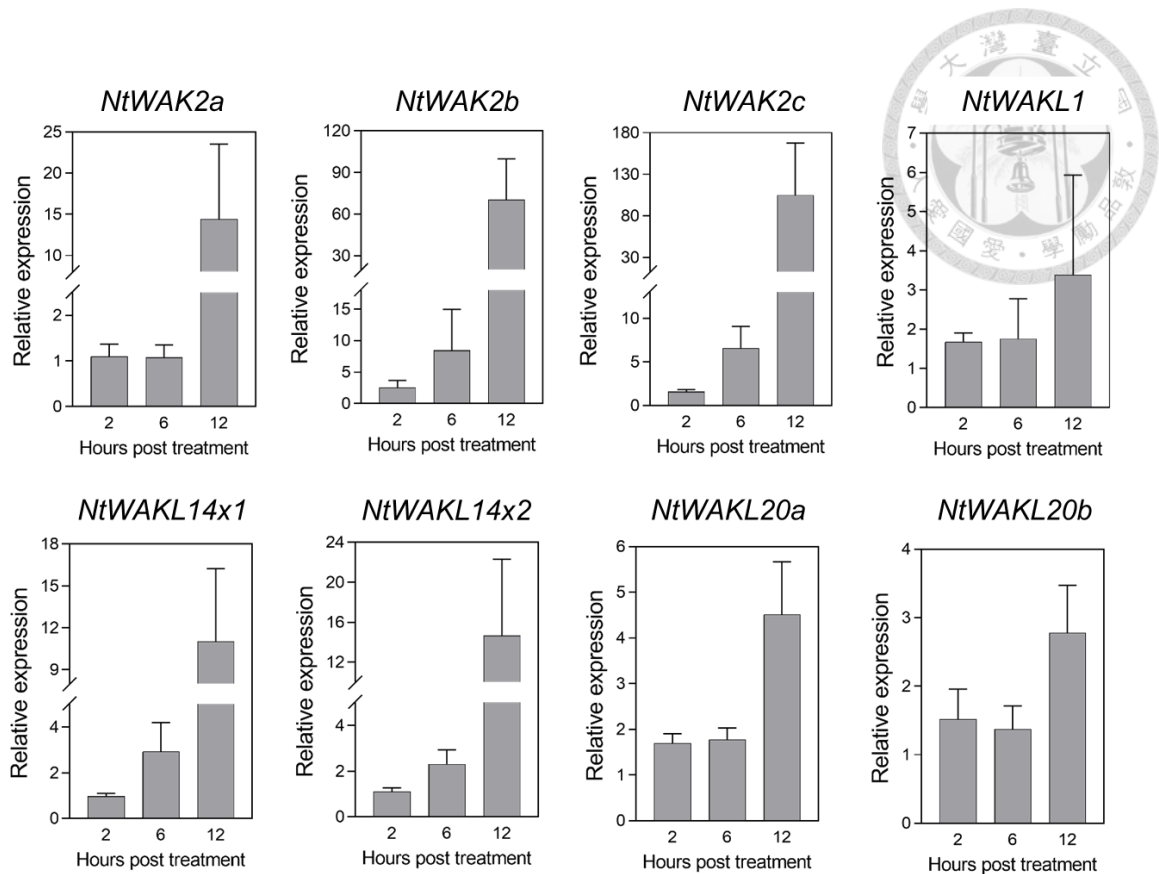
圖二、利用 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 分析純化完成之 OPEL 重組蛋白。

Fig 2. Analysis of purified OPEL recombinant protein by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Glutathione S transferase (GST)-tagged OPEL recombinant protein from *Escherichia coli* was purified by glutathione affinity chromatography. After treatment with thrombin to remove the GST tag, the samples were separated by gel filtration. Proteins present in the elute (fraction No. 1 to 18) were analyzed by 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie Brilliant Blue. Solid arrow: the OPEL protein bands; hollow arrow: GST protein bands.



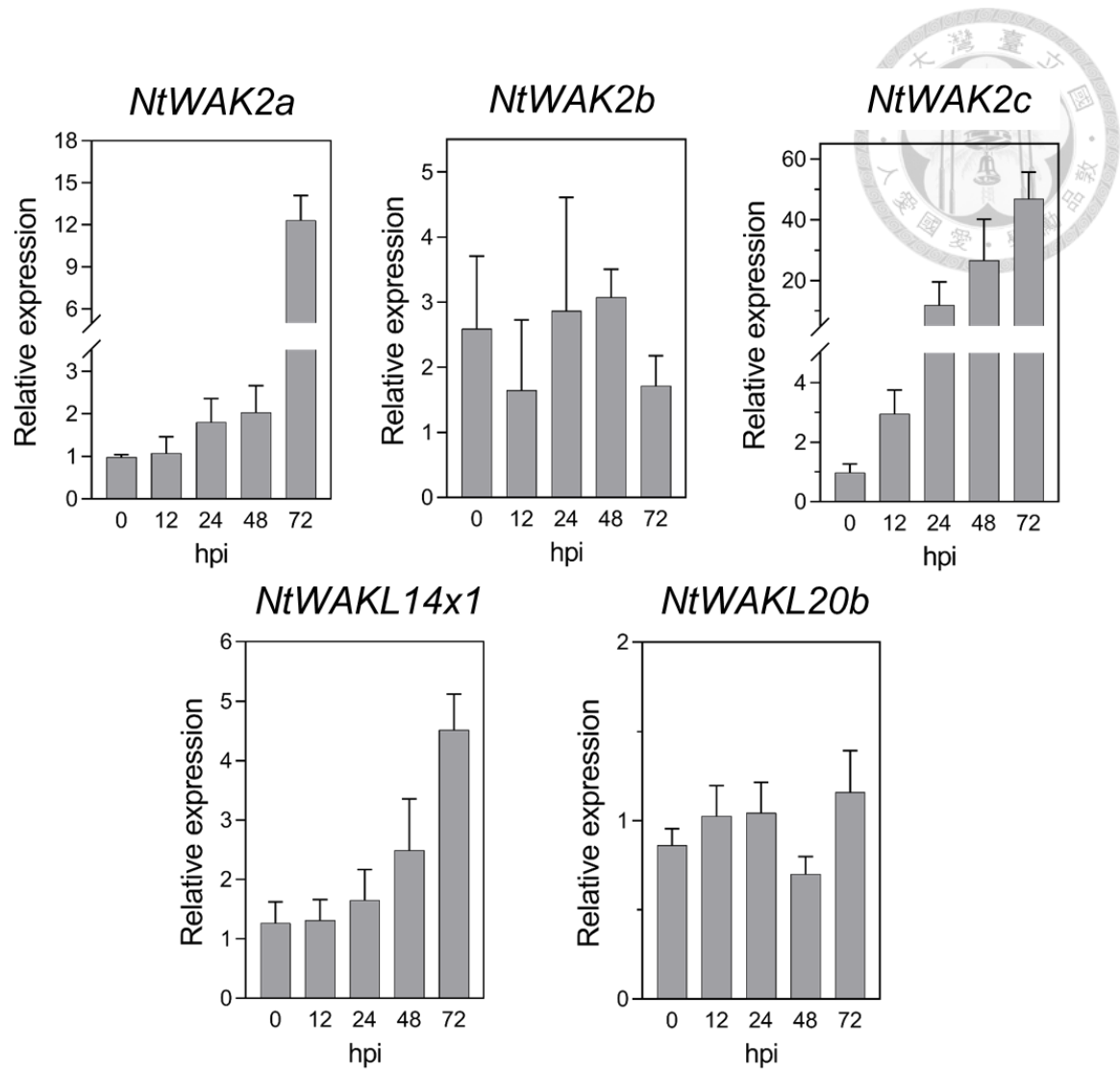
圖三、純化之重組蛋白 OPEL 具有引發植物癒傷葡聚糖沉積的活性。

Fig 3. OPEL recombinant protein can induce callose deposition in *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN). **A.** OPEL induced callose deposition. Two days after treatment of five-week-old *N. tabacum* (cv. Samsun-NN) with 2 μ M OPEL recombinant protein (or MES buffer as a control), the leaves were decolorized and stained with aniline blue. Scale bar = 200 μ m. **B.** Number of callose deposits quantified by using ImageJ. Values are means (\pm SE) of three independent experiments. Asterisk indicates statistically significant differences (* $P < 0.05$) according to the Student's *t*-test.



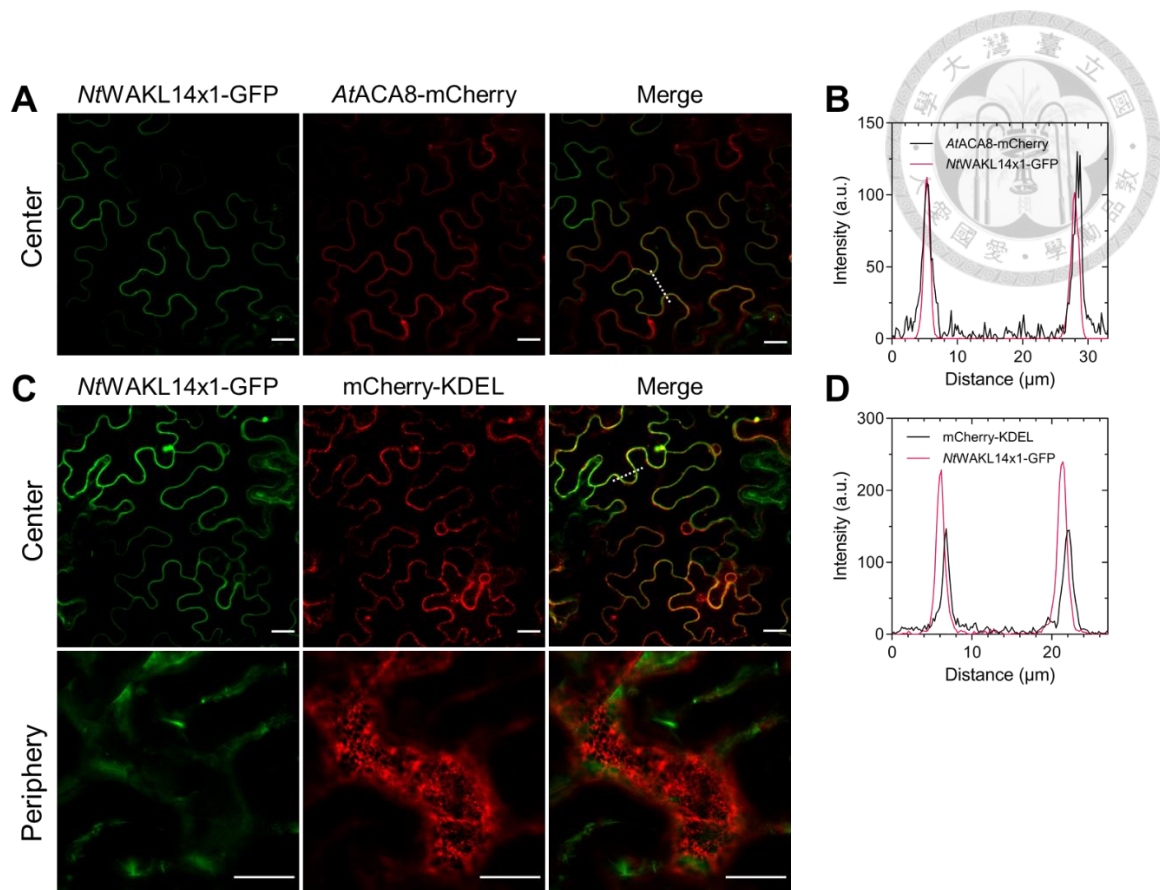
圖四、OPEL 誘導 *NtWAKs* 及 *NtWAKLs* 候選基因之表現。

Fig 4. The expression of candidate *NtWAKs* and *NtWAKLs* is induced by OPEL. After infiltration of 5-week-old *Nicotiana tabacum* (*cv.* Samsun-NN) leaves with 2 μ M OPEL recombinant protein (or MES buffer as a control), plant total RNAs were isolated at indicated hours post treatment and analyzed by qRT-PCR. Raw data was normalized by using the β -*actin* transcripts as internal control and presented as a fold change relative to the control plants from the same time point. Values are means (\pm SE) of three independent experiments.



圖五、*Phytophthora parasitica* 誘導 *NtWAKs* 及 *NtWAKLs* 候選基因之表現。

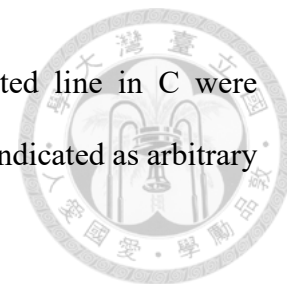
Fig 5. The expression of candidate *NtWAKs* and *NtWAKLs* is induced by *Phytophthora parasitica*. After inoculation of 5-week-old *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) plants with *P. parasitica* zoospores (or sterile water as a control), plant total RNAs were isolated at indicated hours post inoculation (hpi) and analyzed by qRT-PCR. Raw data was normalized by using the β -actin transcripts as internal control and presented as a fold change relative to the control plants from the same time point. Values are means (\pm SE) of three independent experiments.

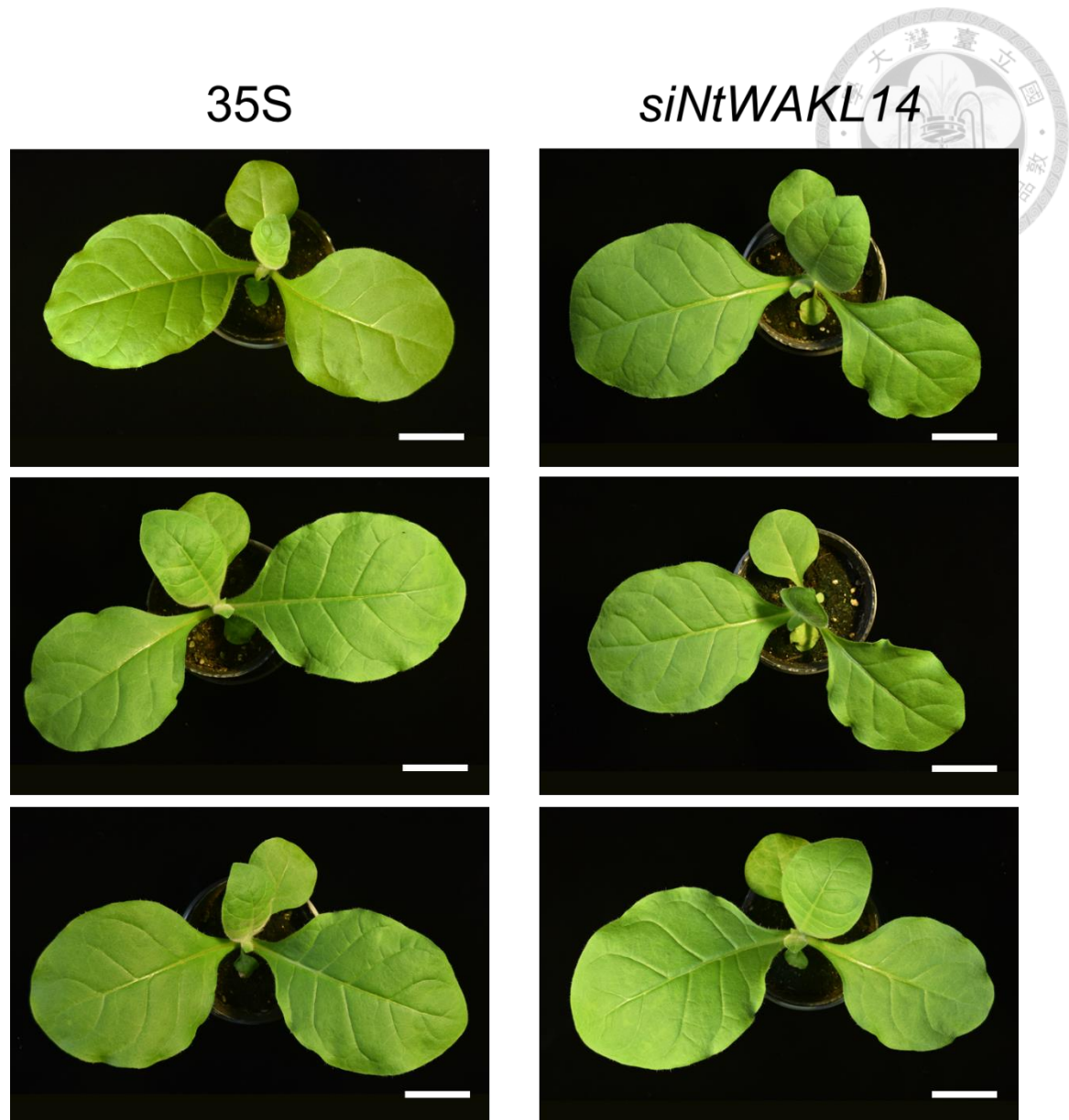


圖六、*NtWAKL14x1-GFP* 位於植物細胞膜。

Fig 6. *NtWAKL14x1-GFP* is localized in the plasma membrane of plant cell. **A.** *NtWAKL14x1-GFP* was colocalized with *AtACA8-mCherry*. Thirty-six hours after agroinfiltration of 32-day-old *Nicotiana benthamiana* to coexpress *NtWAKL14x1-GFP* and *AtACA8-mCherry*, leaves were subjected to confocal microscopy using Zeiss LSM 510 META. Scale bar = 20 μm . **B.** Fluorescence intensity and distribution of *NtWAKL14x1-GFP* and *AtACA8-mCherry*. Fluorescence signals in the positions marked with a dotted line in A were quantitated by using ImageJ. **C.** *NtWAKL14x1-GFP* did not localize to the endoplasmic reticulum (ER). Thirty-six hours after agroinfiltration to coexpress *NtWAKL14x1-GFP* and mCherry-KDEL, *N. benthamiana* leaves were subjected to confocal microscopy using Zeiss LSM 510 META. Center and periphery indicate the equatorial and peripheral sections of epidermal cells, respectively. Scale bar = 20 μm . **D.** Fluorescence intensity and distribution of *NtWAKL14x1-GFP* and mCherry-

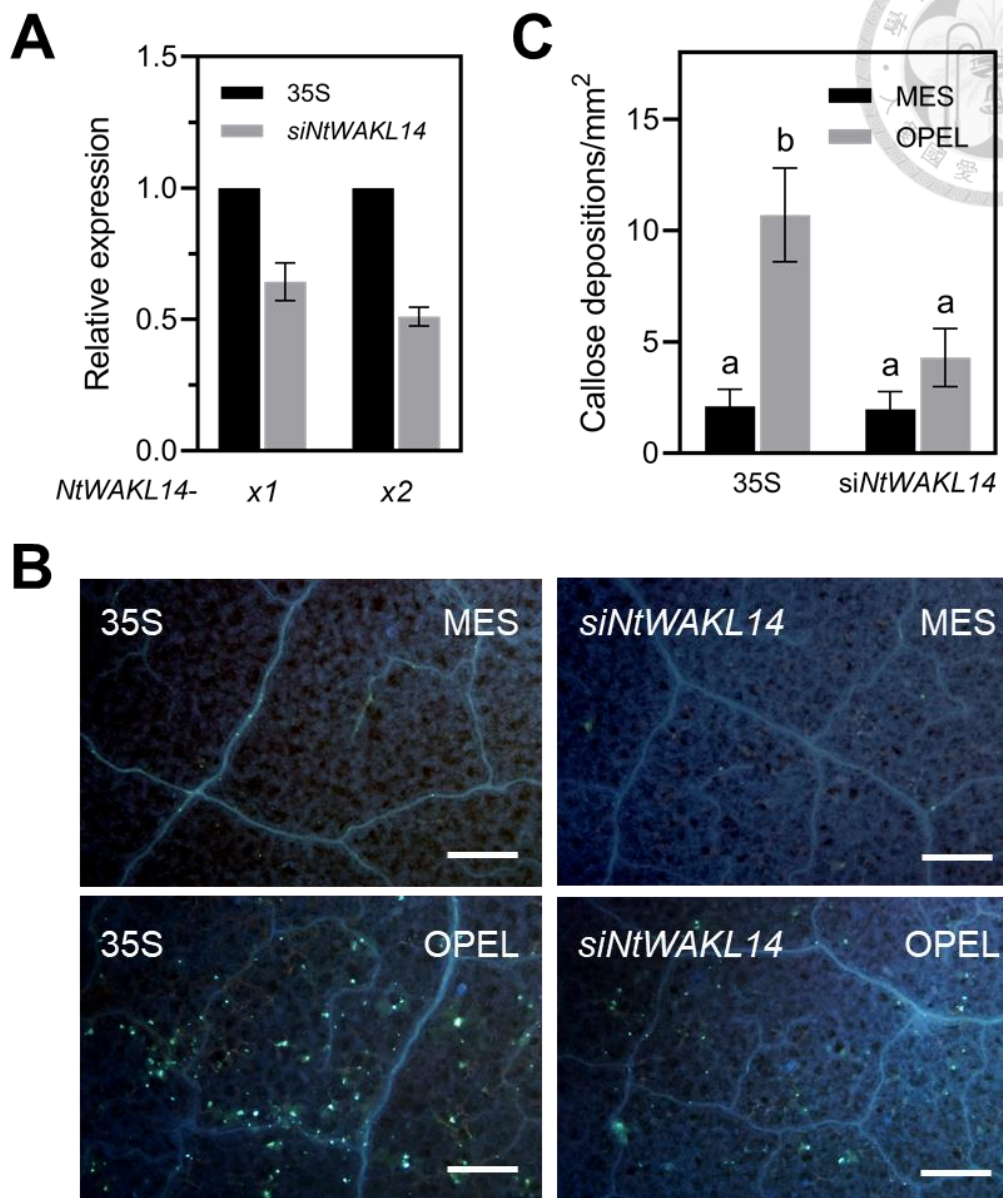
KDEL. Fluorescence signals in the positions marked with a dotted line in C were quantitated by using ImageJ. For B and D, fluorescence intensity is indicated as arbitrary unit (a.u.).





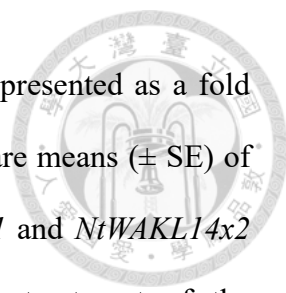
圖七、同時靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 不影響植物的生長與植株表觀。

Fig 7. Silencing of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* had no effect on the growth and appearance of plants. The photographs were taken at 17 days after agroinfection of 18-day-old *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) for CMV-mediated gene silencing of both *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* (*siNtWAKL14*), using plants with CMV::35S (35S) as control. Scale bar = 5 cm.

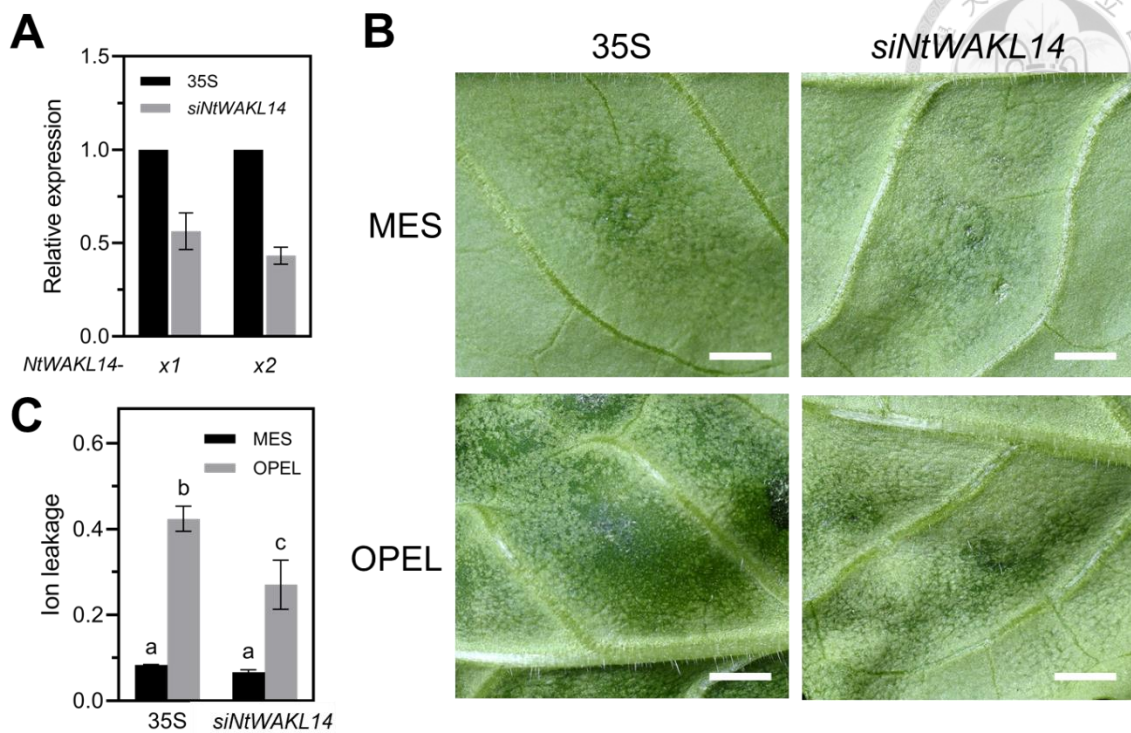


圖八、同時靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 降低 OPEL 引發癒傷葡聚糖累積的能力。

Fig 8. Co-silencing of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* downregulated callose deposition induced by OPEL. A. Downregulation of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* by CMV-mediated gene silencing. Seventeen days after agroinfection of 18-day-old *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) to co-silence *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* (*siNtWAKL14*), total RNAs of systemic leaves were analyzed by qRT-PCR. Raw data was



normalized by using the *β-actin* transcripts as internal control and presented as a fold change relative to the control plants with CMV::35S (35S). Values are means (\pm SE) of three independent experiments. **B.** Downregulation of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* compromised OPEL-induced callose deposition. Two days after treatment of the *siNtWAKL14* or control plants (35S) with 2 μ M OPEL recombinant protein (or MES buffer as a control), the leaves were decolorized and stained with aniline blue. Scale bar = 200 μ m. **C.** Number of callose deposits quantified by using ImageJ. Values are means (\pm SE) of three independent experiments. Different letters indicate statistically significant differences according to two-way ANOVA test.

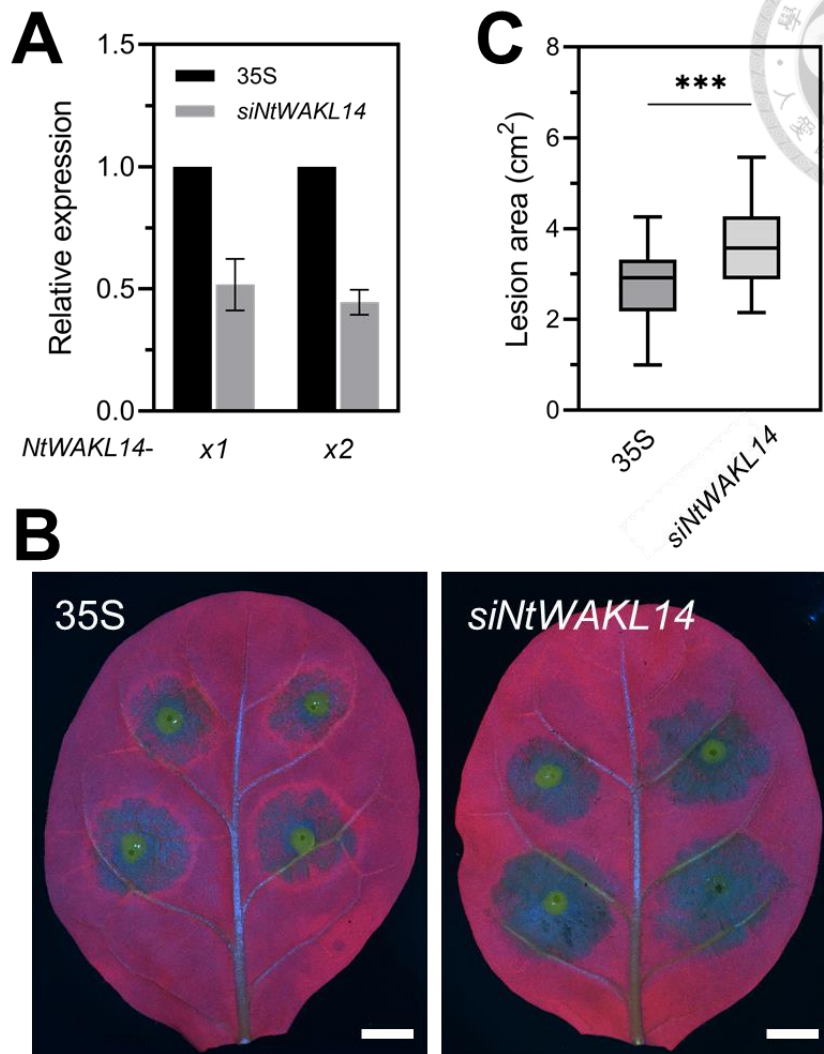


圖九、同時靜默 *NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 降低 OPEL 引發之細胞離子滲漏。

Fig 9. Co-silencing of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* compromised OPEL-induced leaf cell ion leakage. **A.** Downregulation of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* by CMV-mediated gene silencing. Seventeen days after agroinfection of 18-day-old *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) to co-silence *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* (*siNtWAKL14*), total RNAs of systemic leaves were analyzed by qRT-PCR. Raw data was normalized by using the β -actin transcripts as internal control and presented as fold change relative to the control plants with CMV::35S (35S). Values are means (\pm SE) of three independent experiments. **B.** The cell death-inducing activity of OPEL was compromised on the *siNtWAKL14* leaves. The photographs were taken from the underside of leaves two days after treatment with 2 μ M OPEL recombinant protein (or MES buffer as a control). Scale bar = 5 mm. **C.** Downregulation of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* compromised OPEL-induced cell ion leakage. Two days after treatment with OPEL or MES buffer as detailed in B, cell ion leakage was measured by using a conductivity meter. Values are means (\pm

SE) of three independent experiments. Different letters indicate statistically significant difference according to two-way ANOVA test.





圖十、同時靜默 *NtWAKL14 x1* 與 *NtWAKL14x2* 降低植物對於 *Phytophthora parasitica* 的抗病性。

Fig 10. Co-silencing of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* declined plant resistance toward *Phytophthora parasitica*. A. Downregulation of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* by CMV-mediated gene silencing. Seventeen days after agroinfection of 18-day-old *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) to co-silence *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* (*siNtWAKL14*), total RNAs of systemic leaves were analyzed by qRT-PCR. Raw data was normalized by using the β -actin transcripts as internal control and presented as a fold change relative to the control plants with CMV::35S (35S). Values are means (\pm SE) of

three independent experiments. **B.** Disease symptoms caused by *P. parasitica* infection. The *siNtWAKL14* and control plants were inoculated with *P. parasitica* zoospores (10^4 - 10^5 spores/mL). The photographs were taken under blue light at 48 hours post inoculation. Scale bar = 1 cm. **C.** Quantification of lesion areas. The infection areas were quantitated by using ImageJ. The box plot includes 54 values from three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences (***) $P < 0.001$) according to the Student's *t*-test.

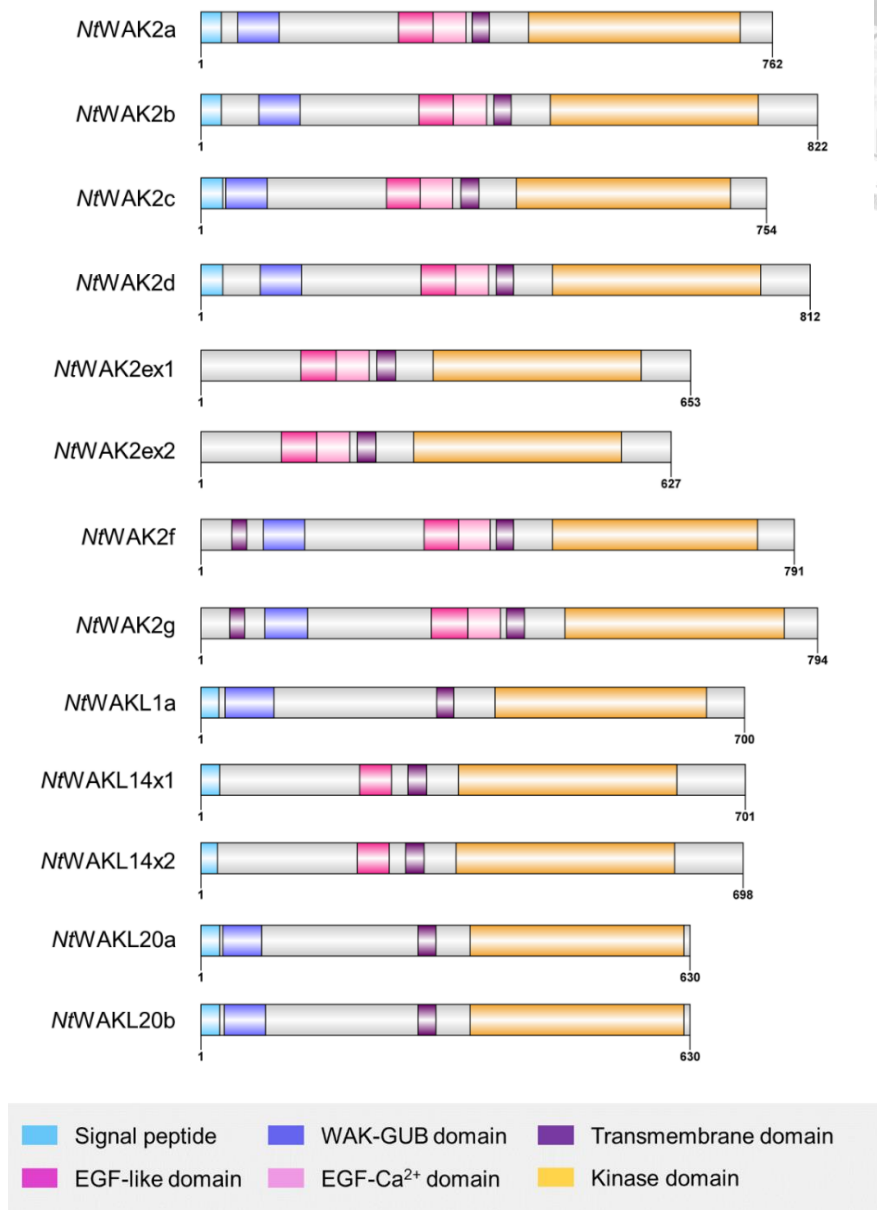
附 錄



附表一、*NtWAKs* 與 *NtWAKLs* 候選基因在預處理 OPEL 重組蛋白的 *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) 葉片轉錄體之表現情形 (柯，2019)。

Table S1. The expression levels of candidate *NtWAKs* and *NtWAKLs* as shown by transcriptome analysis of *Nicotiana tabacum* (cv. Samsun-NN) leaves treated with OPEL recombinant protein (柯，2019).

Gene name	NCBI description	Gene ID	Accession number	<i>p</i> value	Fold change	DEG
<i>NtWAK2a</i>	WAK2-like	107771498	XP_016446359.1	8.96E-08	16.7	Yes
<i>NtWAK2b</i>		107776033	XP_016451332.1	1.78E-34	528.2	Yes
<i>NtWAK2c</i>		107830571	XP_016513667.1	2.24E-13	24.4	Yes
<i>NtWAK2d</i>		107771394	XP_016446238.1	2.35E-26	161.1	Yes
<i>NtWAK2ex1</i>		107800879	XP_016479623.1	5.39E-17	22.1	Yes
<i>NtWAK2ex2</i>			XP_016479624.1			
<i>NtWAK2f</i>		107779692	XP_016455653.1	1.67E-16	52.3	Yes
<i>NtWAK2g</i>		107817466	XP_016498782.1	4.16E-05	11.4	Yes
<i>NtWAK2h</i>		107797767	XP_016476173.1	1.54E-13	47.1	Yes
<i>NtWAKL1a</i>	WAKL1	107814201	XP_016495053.1	6.50E-06	8.6	Yes
<i>NtWAKL14x1</i>	WAKL14	107806264	XP_016485875.1	9.87E-10	7.3	Yes
<i>NtWAKL14x2</i>			XP_016485882.1			
<i>NtWAKL20a</i>	WAKL20	107771892	XP_016446839.1	1.17E-12	15.7	Yes
<i>NtWAKL20b</i>		107811265	XP_016491644.1	3.59E-07	6.7	Yes



附圖一、基因表現量受 OPEL 重組蛋白影響之 *NtWAKs* 與 *NtWAKLs* 的預測蛋白結構域示意圖。

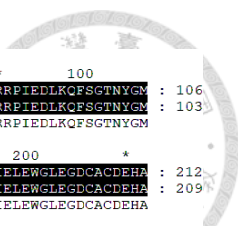
Fig S1. Predicted protein domain structure of *NtWAKs* and *NtWAKLs* showing differential expression in response to treatment with OPEL recombination protein.

Conserved protein domains were predicted by using InterProScan, SMART and SignalP 6.0. Schematic diagram of predicted protein domains was drawn manually using DOG 2.0 software.



附圖二、*NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 之 cDNA 序列併列分析與引子對設計。

Fig S2. Alignment of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* cDNA sequences and design of primers. Partial cDNA sequences (5' portion) of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* were aligned by using ClustalW implemented in MEGA 11. Green arrow: the start of *NtWAKL14x1* open reading frame (ORF). Green bars: primers 264x1_qF and 264x1_qR for qRT-PCR analysis of *NtWAKL14x1*. Orange arrow: the start of *NtWAKL14x2* ORF. Orange bars: primers 264x2_qF and 264x2_qR for qRT-PCR analysis of *NtWAKL14x2*. Blue bars: primers 264_sF and 264_sR for subcloning of DNA fragments used to construct plasmid vectors for CMV-mediated gene silencing of both *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2*.



```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
NtWAKL14X1 : MVEDETLIRFVFSILLVWSSSSVGAANSTCCNQYSGAASNGQRVYPYFPGFSGCTIRLNCTGSGEIRIGEYLIQNVTSDTLMVNFVNCRRPIEDLKQFSGTNYGM : 106
NtWAKL14X2 : ---MKEVIRFVFSILLVWSSSSVGAANSTCCNQYSGAASNGQRVYPYFPGFSGCTIRLNCTGSGEIRIGEYLIQNVTSDTLMVNFVNCRRPIEDLKQFSGTNYGM : 103
      R F V F S I L L V W S S S V G A A N S T C C N Q Y S G A A S N G Q R V Y P Y F P G F S G C T I R L N C T G S G E I R I G E Y L I Q N V T S D T L M V N F V N C R R P I E D L K Q F S G T N Y G M

      *      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *
NtWAKL14X1 : FWRNGLLLQNCVYPRSECTIPSDLLSARLNIPSCDSKKNENVCYSEATADYLDYWKLNIGCGLVVSSILVGMNNTKSSSMYLEPQTTELEWGLEGDCACDEHA : 212
NtWAKL14X2 : FWRNGLLLQNCVYPRSECTIPSDLLSARLNIPSCDSKKNENVCYSEATADYLDYWKLNIGCGLVVSSILVGMNNTKSSSMYLEPQTTELEWGLEGDCACDEHA : 209
      T W R N G L L L Q N C V Y P R S E C T I P S D L L S A R L N I P S C D S K K N E N V C Y S E A T A D Y L D Y W K L N I G C G L V V S S I L V G M N N T K S S M Y L E P Q T T E L E W G L E G D C A C D E H A

      220      *      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      3
NtWAKL14X1 : NCTNIFLPGNRNGFRRCCKDGFVGDGFRDGDGCRKVKSKCNPSRYLSGRCCGTRIGVLTGGIAGAGLMAALAILCYCIRRRSASLKKRMSAKRLLSEAGSSSVF : 318
NtWAKL14X2 : NCTNIFLPGNRNGFRRCCKDGFVGDGFRDGDGCRKVKSKCNPSRYLSGRCCGTRIGVLTGGIAGAGLMAALAILCYCIRRRSASLKKRMSAKRLLSEAGSSSVF : 315
      N C T N I F L P G N R N G F R C R C K D G F V G D G F R D G D G C R K V K S K C N P S R Y L S G R C C G T R I G V L T G G I A G A G L M A A L A I L C Y C I R R R S A S L K K R M S A K R L L S E A G S S S V F

      20      *      340      *      360      *      380      *      400      *      420
NtWAKL14X1 : MFQYKEIEKATNSFSEKQRLGIGAYGTVYAGKLHSEDEWVAIKKLRHRDPDGEVQVMNEIKLLSSVSHPNIVRLLGCCIENGEQILVYEFMPNGTLACHLQREERG : 424
NtWAKL14X2 : MFQYKEIEKATNSFSEKQRLGIGAYGTVYAGKLHSEDEWVAIKKLRHRDPDGEVQVMNEIKLLSSVSHPNIVRLLGCCIENGEQILVYEFMPNGTLACHLQREERG : 421
      M F Q Y K E I E K A T N S F S E K Q R L G I G A Y G T V Y A G K L H S E D E W V A I K K L R H R D P D G E V Q V M N E I K L L S S V S H P N I V R L L G C C I E N G E Q I L V Y E F M P N G T L A C H L Q R E E R G S

      *      440      *      460      *      480      *      500      *      520      *
NtWAKL14X1 : LPWTIRLTIATETAQAIAHLHSAMNPPYIHRDIKSSNILLDYFNFSKVADFGLSRFGMTDDSHISTAPCGTPGYVDPQYHCNYHLSDRSDVYSFGVVLIEITALK : 530
NtWAKL14X2 : LPWTIRLTIATETAQAIAHLHSAMNPPYIHRDIKSSNILLDYFNFSKVADFGLSRFGMTDDSHISTAPCGTPGYVDPQYHCNYHLSDRSDVYSFGVVLIEITALK : 527
      L P W T I R L T I A T E T A Q A I A H L H S A M N P P Y I H R D I K S S N I L L D Y F N F S K V A D F G L S R F G M T D D S H I S T A P C G T P G Y V D P Q Y H C N Y H L S D R S D V Y S F G V V L I E I T A L K

      540      *      560      *      580      *      600      *      620      *
NtWAKL14X1 : VVDFSRPHSEINLAALAI DRIGKGRVDEIIDPFLEPHRDAWTLSSVHRIAEAFRCLAFHRDMRPSMIEVADELEQIRLSSWTSLEDNICMTSSVNSSCSSPRMS : 636
NtWAKL14X2 : VVDFSRPHSEINLAALAI DRIGKGRVDEIIDPFLEPHRDAWTLSSVHRIAEAFRCLAFHRDMRPSMIEVADELEQIRLSSWTSLEDNICMTSSVNSSCSSPRMS : 633
      V V D F S R P H S E I N L A A L A I D R I G K G R V D E I I D P F L E P H R D A W T L S S V H R I A E A F R C L A F H R D M R P S M I E V A D E L E Q I R L S S W T S L E D N I C M T S S V N S S C S S P R M S

      640      *      660      *      680      *      700
NtWAKL14X1 : ETSFRSTTTKKGVGSRRLIFPQKIGNALSTMEEIKDSSPVSVQDPWLSEESPSTNRLGSAGR : 701
NtWAKL14X2 : ETSFRSTTTKKGVGSRRLIFPQKIGNALSTMEEIKDSSPVSVQDPWLSEESPSTNRLGSAGR : 698
      E T S F R S T T T K K G V G S R R L I F P Q K I G N A L S T M E E I K D S S P V S V Q D P W L S E E S P S T N R L L G S A G R
  
```

附圖三、*NtWAKL14x1* 與 *NtWAKL14x2* 之蛋白序列併列分析。

Fig S3. Alignment of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* protein sequences. Full length protein sequences of *NtWAKL14x1* and *NtWAKL14x2* were aligned by using ClustalW implemented in MEGA 11.