

中華民國第 61 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

第二名

052206

利用植物菌質體探討菟絲子的蔓延與攀附

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 翁伊瑩 高二 劉韋岑	指導老師： 陳玉珊
-------------------------	--------------

關鍵詞：菟絲子、植物菌質體、TCP 轉錄因子

摘要

本研究利用植物菌質體找出菟絲子蔓延與攀附之調控機制。首先，觀察發現感染植物菌質體之平原菟絲子(*C. campestris* Yunck.)會產生多分支及莖短化的病徵。接著，測定感病之菟絲子體內植物菌質體 SP1 蛋白的表現量。本研究利用 MEGA-X 軟體，依照保留性高的 TCP domain 序列進行親緣演化分析，找出分別屬於 TB1/CYC 和 CIN 群的菟絲子 TCP1 與 TCP2 轉錄因子；利用 RT-PCR 確認平原菟絲子 TCP1 與 TCP2 基因表現；以 pBA-N-SFP 載體進行分子選殖，透過農桿菌浸潤法短暫表現菟絲子 TCP1 與 TCP2 轉錄因子(CaTCP1、CaTCP2)及植物菌質體 SP1 蛋白。最後，利用西方墨點法確認植物菌質體 SP1 蛋白能降解 CaTCP1 及 CaTCP2。因此，本研究推測感病菟絲子產生多分支及莖短化的機制，為植物菌質體分泌的 SP1 蛋白降解平原菟絲子 TCP 轉錄因子所致。

壹、研究動機

我們常常能在路邊或是荒地上看到一大片金黃色菟絲子覆蓋在草叢上，不久之後，原本鮮綠的草叢便會漸漸乾枯。號稱「植物殺手」的菟絲子，為旋花科之絕對寄生蔓性草本植物，不具有葉、根等構造，無法行光合作用，可利用柔軟捲鬚狀的莖纏繞攀爬宿主，並藉由吸器吸收植物宿主篩管內的養分及水分，導致宿主營養不良而死亡，在農業上造成嚴重損失的同時，也會傳播病原菌至不同個體間，加速疾病傳播。

目前盛行於台灣地區的菟絲子有五種，分別是南方菟絲子(*C. australis* R. Br.)、平原菟絲子(*C. campestris* Yunck.)、中國菟絲子(*C. chinensis* Lam.)、台灣菟絲子(*C. japonica* var. *formosana*)及日本菟絲子(*C. japonica*)。現今防治菟絲子的方法有化學防治、生物防治以及人力機械拔除：化學防治如使用除草劑，但除草劑本身並沒有選擇性，施用時會對植物宿主造成影響，產生藥害，減少作物收成，而同時也造成環境汙染；生物防治如利用炭疽病菌感染菟絲子（陳、蔣，2004），雖然具有專一性，但防治效果受環境濕度、溫度、濃度等因素影響，目前並未普遍應用；人力拔除則缺乏效率，由於菟絲子只需莖的片段便可快速繁殖，其種子更可存活長達五年之久，因此不易根除且極易蔓延。

由於菟絲子為絕對寄生之植物，因此研究上十分困難。近年來因為基因組定序技術進步，菟絲子的基因組密碼已被解出(Vogel et al., 2018)。雖然由定序分析結果可知菟絲子有許多基因在演化過程中流失，但保留之基因由於缺乏基因突變株及基因轉殖工具，難以了解其基因之功能。為了找出菟絲子蔓延攀附的分子機制，本研究需要建立一套分析工具。

已知目前有一種絕對寄生之植物細菌稱為植物菌質體(Phytoplasma)，會改變宿主植物之外表性狀，造成植株矮化、花器葉化、植株黃化、多分支及簇葉等病徵。已知此病徵為植物

菌質體藉由分泌蛋白降解與植物細胞生長發育相關之因子所致，如植物菌質體 Phyllogen 蛋白會降解調控花器發育的 MADS box 轉錄因子；SP1 蛋白會降解調控葉片發育與分支性狀之 TCP 轉錄因子(Sugio et al., 2011)。植物菌質體生存於植物篩管內，可以透過嫁接、昆蟲口器及菟絲子吸器，侵入植物維管束達到傳播的目的。現階段觀賞用之聖誕紅，便是利用植物菌質體透過嫁接的方式進行園藝性狀改良，使植株出現矮化及多分支之商業性狀。

植物菌質體與菟絲子同為絕對寄生之生物，雖然植物菌質體能透過菟絲子傳播，但目前仍不清楚植物菌質體是否可以改變菟絲子的外表性狀。若植物菌質體能使菟絲子產生多分支及莖短化，便有機會找出調控菟絲子蔓延攀附之相關性狀因子，進而利用此調控因子發展防治菟絲子之最佳模式。

貳、研究目的

- 一、 田間採集菟絲子與 ISSR 分子標誌鑑定採集菟絲子之種類。
- 二、 觀察感染植物菌質體之菟絲子生長發育的差異性。
- 三、 確認感染植物菌質體之菟絲子性狀差異與植物菌質體 SP1 蛋白表現之關聯性。
- 四、 分析製作菟絲子 TCP 轉錄因子(CaTCP)親緣演化樹並分子選殖菟絲子之 TB1/CYC 和 CIN 群之 TCP 轉錄因子。
- 五、 確認菟絲子之 TB1/ CYC 和 CIN 群之 TCP 轉錄因子與菌質體 SP1 蛋白的交互作用關係。
- 六、 綜合分析調控菟絲子蔓延與攀附的分子機制。

參、研究設備及器材

一、 實驗材料：

田間菟絲子(彰化縣線西鄉)、感染植物菌質體之植株(感病絲瓜來源，由實驗室提供)。

二、 軟體：

Vector NTI、MEGA-X、Image-4000。

三、 實驗設備：

微量分光光度計(Implen/NP80-Touch)、恆溫水槽(TKS/WB212-B2)、培養箱(TKS/OSI-500F)、電源供應機(Major Science/MP300V)、桌上微量離心機(Beckman Coulter/Micrefuge2)、冷光影像系統(GE Healthcare/LAS 4000mini)、蛋白質電泳槽(Amersham Biosciences/TE22)、熱循環機(Thermal Cycler)。

肆、研究過程或方法

一、實驗架構



二、文獻探討

(一) 菟絲子種類鑑定

因不同種的菟絲子在外觀上無明顯差異，文獻得知可以利用簡單序列重複區間 ISSR(Inter Simple Sequence Repeat)來判斷其種類，對基因組進行 PCR 擴增。依不同菟絲子種類擴增出的 DNA 序列長度差異，判斷菟絲子的種類。(謝等，2012)

(二) 植物 TCP 轉錄因子家族之功能性解說

TCP(Teosinte-Branched, Cycloidea, Proliferation)轉錄因子存在於維管束植物，參與植物生長發育，包含調控植物激素分泌、生理時鐘、葉、莖及花器等相關性狀的發育(Zheng et al., 2018)。TCP 轉錄因子在演化上具有一段高度保留性的序列，稱為 TCP domain。依照 TCP domain 序列差異度，能將 TCP 轉錄因子分成主要兩大類：第一類包含 PCF 群；第二類包含 CYC/TB1 群及 CIN 群(Cubas et al., 1999)。其中 CYC/TB1 群 TCP 轉錄因子主要調控腋芽生長；CIN 群 TCP 轉錄因子則主要調控葉片發育。

(三) 植物菌質體 SP1 蛋白降解 TCP 轉錄因子之機制解說

由先前研究(簡，2020)得知與 SP1 蛋白(Secretory Protein 1)相似之致病因子存在於不同種間的植物菌質體，但因彼此蛋白序列的差異度較大，因此可以結合與降解之 TCP 轉錄因子類群也有所不同。如：翠菊黃萎簇葉病植物菌質體之 SP1 相似蛋白具有入核訊號胜肽，能夠同時降解第二類 CYC/TB1 及 CIN 群之 TCP 轉錄因子；花生簇葉病植物菌質體之 SP1 相似蛋白並無入核訊號胜肽，且只能夠降解 CYC/TB1 之 TCP 轉錄因子。

三、實驗方法

(一) 利用 ISSR 分子標定技術鑑定採集菟絲子之種類：

選定 UBC 823 之引子，以聚合酶連鎖反應 PCR 擴增出菟絲子 DNA 片段，並透過 DNA 凝膠電泳觀察增幅出之片段長度，以判斷其種類。(引子序列標示於附錄一)

(二) 觀察感染植物菌質體之菟絲子病徵：

1. 培養採集之菟絲子種子，待其發芽，將芽苗置於感染植物菌質體之宿主（感病絲瓜來源，由實驗室提供）上，使芽苗附著寄生，觀察性狀差異。
2. 將健康菟絲子的新鮮枝條直接置於感染植物菌質體之宿主（感病絲瓜來源，由實驗室提供），待其成功寄生後，觀察性狀變化。

(三) 西方墨點法：

1. 凝膠溶液配製(Tricine SDS-PAGE)：

(1) 4 ml of Separation Gel：將 2.64 ml of 30% Acrylamide mixture、1.6 ml of 3 M Tris、0.08 ml of ddH₂O、0.48 ml of 100% Glycerol、36 μ l of APS（灌膠前再加）、3.6 μ l of TEMED 混和。

(2) 1 ml of Spacer Gel：將 0.5 ml of 30 % Acrylamide mixture、0.5 ml of 3 M Tris、0.5 ml of ddH₂O、11.25 μ l of APS（灌膠前再加）、1.125 μ l of TEMED 混和。

(3) 1 ml of Stacking Gel：將 0.2 ml of 30 % Acrylamide mixture、0.375 ml of 3 M Tris、0.925 ml of ddH₂O、18.75 μ l of APS（灌膠前再加）、1.875 μ l of TEMED 混和。

2. 製備蛋白質樣本（組織）：使用液態氮及研鉢磨碎植物組織，以體積比 1:1 將組織粉末與 protein sample dye (2.5x)混和均勻，加熱 100°C，10 分鐘，震盪後，再於 100 度加熱 10 分鐘。

3. 蛋白質凝膠電泳：將已凝固之膠片放入電泳槽內，膠內加入陰極緩衝液(Cathode buffer)、膠外加入陽極緩衝液(Anode buffer)，將樣品注入膠槽，插上電極，以電壓 50V、30 分鐘；電壓 100V、30 分鐘；電壓 150V、90 分鐘進行電泳。

4. 轉漬（濕轉）：以甲醇浸溼 PVDF 膜，另以 transfer buffer (CAPS)浸溼濾紙及海綿墊，將膠片取下，依序夾入海綿墊、濾紙、膠片、PVDF 膜、濾紙、海綿墊，稍壓使密合，置入轉漬槽，並加滿 transfer buffer (CAPS)，以電壓 45V，電流 400 mA 放置隔夜進行轉漬。

5. 封閉(blocking)：將 100 ml of 1xTBST (1xTBS、0.01xTWEEN-20)與 5 克脫脂奶粉混和(blocking buffer)，將 PVDF 膜浸入 blocking buffer，以 50 rpm 搖晃 1 小時。

6. 一級抗體反應：blocking buffer 加入一級抗體（實驗室提供），PVDF 膜加入一抗緩

衝液，可用夾鏈袋集中溶液，以 50 rpm 搖晃 1 小時。

7. 以 1xTBST 清洗膜：

以 1xTBST 分別搖晃 30 秒、30 秒、5 分鐘、10 分鐘、10 分鐘(75rpm)。

8. 封閉(blocking)：將 100 ml of 1xTBST(1xTBS、0.01xTween-20)與 5 克脫脂奶粉混和 (blocking buffer)，PVDF 膜加入 blocking buffer，以 50 rpm 搖晃 30 分鐘。

9. 二級抗體反應：在 blocking buffer 中加入二級抗體（實驗室提供），並將 PVDF 膜浸入 blocking buffer，以 50 rpm 搖晃 1 小時。

10. 以 1xTBST 清洗膜：重複步驟 7。

11. 呈色：分別將冷光試劑 ECL-A 及 ECL-B 各 500 ml 混和，馬上塗於膜上，並夾入塑膠膜，等 10 秒後，放入另一塑膠套等待顯色。

12. 利用 Image-4000 進行冷光觀測結果。

(四) 分析菟絲子 TCP 轉錄因子親緣演化關係及進行分子選殖：

1. 自 NCBI 網站查詢菟絲子基因資料庫(Sun et al., 2018)。

2. 利用軟體 Vector NTI 將阿拉伯芥 TCPs(AtTCPS)、絲瓜 TCP1(LaTCP1)及菟絲子 TCPs(CaTCPs)進行多重序列比對，找出高度保留性區域(TCP domain)。

3. 利用 MEGA-X 分析 TCP domain 相似度，製作親緣關係樹判斷其親緣關係，以找出 CaTCPs 分類情形。

(五) 萃取菟絲子之 mRNA(TRIzol RNA 萃取)：以液態氮及研鉢研磨成粉末(400 μ l)，加入 1ml of TRIzol Reagent 搖晃至全溶，靜置於 4°C，10 分鐘，加入 250 μ l of 氯仿，震盪 30 秒，靜置冰上 2 分鐘，4°C 離心 12000 rpm 10 分鐘，將上清液加入 250 μ l of 氯仿，震盪後在 4°C 離心 12000 rpm 10 分鐘，上清液加入 500 μ l of 丙醇，輕晃後，在 4°C 離心 14000 rpm 10 分鐘，去除上清液在 4°C 離心 14000 rpm 10 分鐘，吸乾上清液，加入 75 %酒精，使沉澱物懸浮在 4°C 離心 14000 rpm 10 分鐘，吸乾上清液；4°C 離心 14000 rpm 10 分鐘，吸乾上清液，倒置晾乾沉澱物，加入 45 μ l of DEPC 水，放置冰上，打散沉澱物，震盪，離心，在 65°C 加熱 2 分鐘，置冰上 5 分鐘；4°C 離心 12000 rpm 10 分鐘，取上清液，冰上保存。

(六) 反轉錄聚合酶連鎖反應合成菟絲子 cDNA：以分光光度計測定 mRNA 濃度後進行定量(OD₂₆₀=0.5)，再進行反轉錄聚合酶連鎖反應：將 1 μ l of mRNA template、5 μ l of 2X RT-reaction mix、3 μ l of DEPC 水、10 μ l of Taq buffer 混勻。放入熱循環機，先以 25°C 放置 10 分鐘，再以 42°C 放置 60 分鐘，加熱 85°C、10 分鐘，最後以 4°C 暫存。於降溫後，加入 1 μ l of RNase。

(七) 菟絲子 TCP 基因的分子選殖：

1. 利用 Vector NTI 分析軟體檢視載體 pBA-N-SFP (由實驗室提供) 之限制酶切位，並設計引子 (引子序列見附錄二)。利用聚合酶連鎖反應擴增目標基因，以 DNA 凝膠電泳(1×TBE)確認是否擴增成功。此外，萃取大腸桿菌質體 (pBA-N-SFP，實驗室提供) (使用 Gene Mark Kit)。
2. 合成目標基因：
 - (1)以聚合酶連鎖反應擴增目標基因，再以凝膠電泳(1×TBE)確認結果。純化擴增之目標基因：使用 Gene Mark Kit (PCR clean-up)。
 - (2)限制酶切割：

將質體、目標基因、10×緩衝液、ddH₂O 輕微混勻，放置 37°C 水浴機，反應 3 小時。純化合成之基因：使用 Gene Mark Kit (PCR clean-up)，以凝膠電泳(1×TBE) 確認濃度。黏合目標基因及質體：先將 1 μ l of 質體、5 μ l of 目標基因混勻，再加入 6 μ l of DNA Ligase solution 輕微混勻，於室溫靜置 3 小時。
 - (3)轉殖 *E. coli* (菌種：DH5 α ，實驗室提供)：將勝任細胞平放冰上回溶，把質體樣本與細胞輕輕混勻，置於冰上 30 分，再以 42°C 水浴 2 分鐘，冰上 5 分鐘，加入無抗生素細菌培養液(LB)，置於 37°C 生長箱搖晃 1 小時，以 4°C、以 5000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液去除，使菌懸浮於殘留之 LB，置於細菌培養基 (固態，含抗生素) 上，於 37 °C 生長箱放置隔夜。
 - (4)選取菌落進行菌落聚合酶連鎖反應，以 DNA 凝膠電泳確認是否轉殖成功。
 - (5)萃取轉殖成功大腸桿菌之質體 DNA：使用 Gene Mark Kit，並測量 OD₂₆₀ 值以確認質體 DNA 濃度。
 - (6)使用限制酶切割切位，確認目標基因是否正確：將重組基因、10×緩衝液、限制酶和 ddH₂O 混勻。靜置 37°C 水浴反應。以 DNA 凝膠電泳確認目標基因長度。
 - (7)將目標基因定序，確認轉殖基因之序列：由基龍米克斯生物科技股份有限公司作業，利用 Vector NTI 分析軟體進行序列比對分析。

(八) 農桿菌浸潤法：

1. 基因轉殖農桿菌：將勝任細胞置冰上待回溶，加入 5 μ l of 重組基因，置冰上 5 分鐘。置於液態氮 5 分鐘，再於 37°C 水浴機放置 10 分鐘。加入 700 μ l of 無抗生素之細菌培養液(LB)，置 28°C 斜晃 3 小時。將菌液塗抹至培養基 (含抗生素) 上，於 28°C 靜置 2~3 天。選取菌落進行菌落聚合酶連鎖反應，再以膠體電泳(1×TBE) 檢查是否轉殖成功。

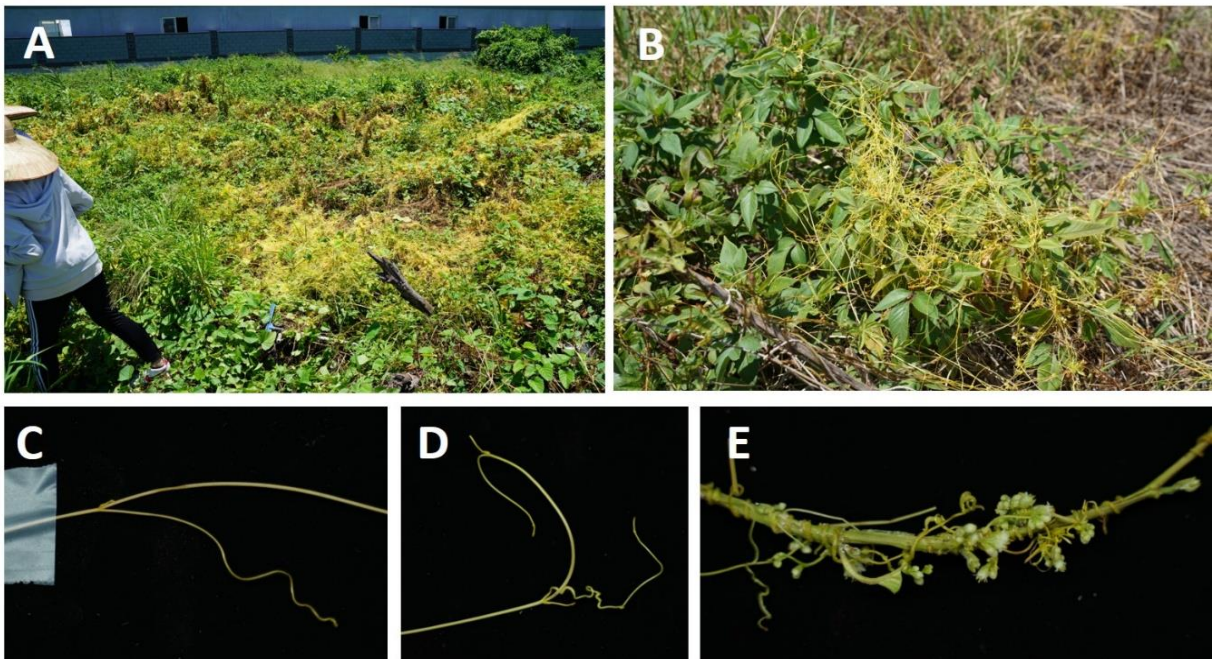
2. 培養農桿菌(3 ml)：目標基因、SP1 蛋白（實驗室提供）、空載體 (pBA-N-SFP，對照組)、nss，以 3 ml of LB (sp)培養，置於 28°C 斜晃一天。
3. 培養農桿菌(10 ml)：
目標基因、SP1 蛋白、空載體 (pBA-N-SFP，對照組)、NSs(nonstructural, NSs)蛋白。
加入 10 ml of LB(sp)、4 μ l of ASG(Acetosyringone)、200 μ l of MES buffer (一種緩衝液)、200 μ l of 菌液。置 28°C 斜晃一天。
4. 培養農桿菌(10 ml)：
目標基因、SP1 蛋白（實驗室提供）、空載體 (pBA-N-SFP，對照組)、NSs，25°C 離心 14000 rpm 15 分。去除上清液，加入 MgCl₂使沉澱物懸浮。利用分光光度計測菌量濃度。依照不同基因表現量多寡調整農桿菌濃度(OD₂₆₀ 值)。
5. 製備菌液：
對照組，不表現 SP1 蛋白：目標基因、空載體、NSs (nonstructural, NSs)蛋白；實驗組，表現 SP1 蛋白：目標基因、SP1 蛋白、NSs (nonstructural, NSs)蛋白。分別加入 15 μ l of ASG，置於室溫靜置 3 小時。
6. 農桿菌感染菸草：挑選兩棵大小一致之菸草（苗齡約一個月）作為對照組及實驗組。每棵選兩片葉齡大小相近之葉片，利用 1 mL 針筒，於其葉背加壓注射懸浮菌液，使葉浸潤菌液，將轉殖菸草放置 2~3 天。

伍、研究結果

一、台灣西部野生菟絲子採集及植物菌質體鑑定

菟絲子在台灣鄉間隨處可見，菟絲子一旦附著在宿主後，便會向外延伸枝條及開花結籽，以迅速擴展其生長範圍，同時大幅消耗宿主養分，常造成受侵襲地區之植物大量死亡，是農業上一大損失。圖一為於彰化縣線西鄉菟絲子危害之情況，可以看到田間之菟絲子呈水平向四面八方蔓延擴展（圖一、A, B）。觀察細部可知，分岔處有 2~3 個枝條向外延伸（圖一、C, D）；卷鬚狀纏繞於宿主上的枝條同時會開花結果（圖一、E）。

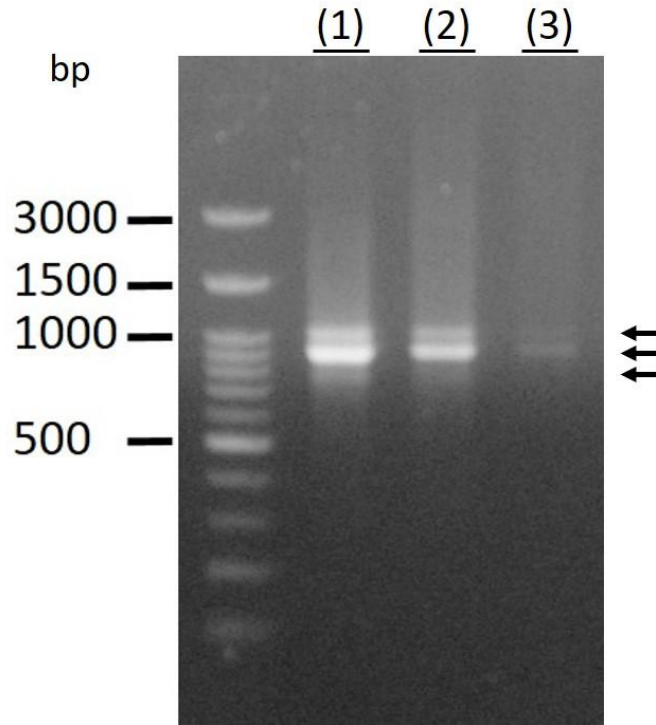
進行田間調查同時，本研究在雲林縣麥寮地區發現疑似感染植物菌質體的蛇瓜。採集後進行分子鑑定，結果發現此為台灣第一例被花生簇葉病植物菌質體感染的葫蘆科植物。日前已將此鑑定結果發表於國際期刊 *Plant Disease* (Weng et al, 2021)（參閱附錄三）。



圖一、彰化線西鄉菟絲子危害情形及外表性狀。(A,B)田間菟絲子寄生附著與蔓延概況；(C, D)菟絲子枝條分枝狀況；(E)菟絲子纏繞於宿主及開花狀況。

二、ISSR 分子標誌鑑定採集菟絲子之種類

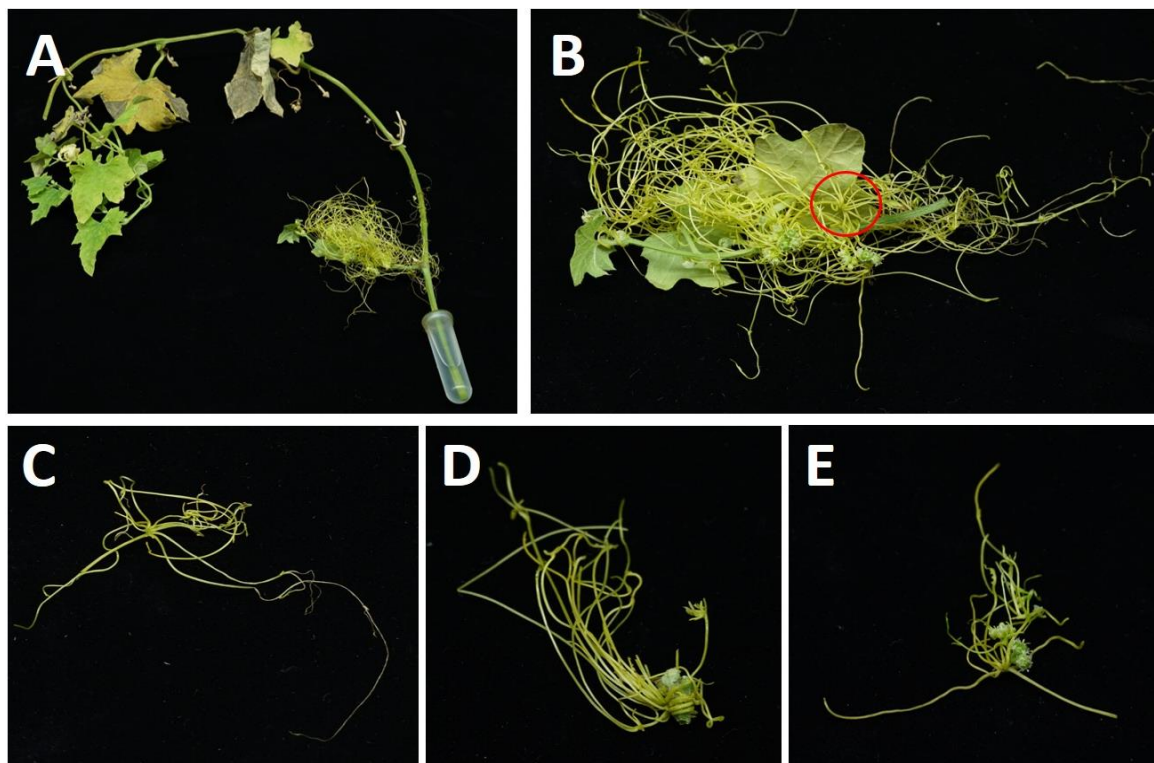
根據文獻資料(謝等, 2012), 平原菟絲子(*C. campestris* Yunck.)之基因體 DNA (gDNA) 以 UBC 823 引子擴增, 將得到 1100 bp、900 bp 及 800 bp 之 DNA 片段。本研究根據 PCR 擴增後的電泳結果, 發現彰化縣線西鄉採集之菟絲子, 經 UBC 823 引子所擴增出的 DNA 片段長度與上述片段長度相符, 且擴增之 DNA 片段條帶亮度與 DNA 模板濃度成正相關(圖二)。因此, 判斷採集的菟絲子種類為平原菟絲子(*C. campestris* Yunck.)。



圖二、菟絲子之 gDNA 以 UBC 823 引子進行 PCR 擴增之電泳結果。Lane (1)之 DNA 模板為 gDNA 萃取原液；Lane (2)之 DNA 模板濃度為 10 ng/ μ l；Lane (3)之 DNA 模板濃度為 1 ng/ μ l。箭頭處由上至下分別顯示了 1100 bp、900 bp、800 bp 之片段。

三、感染植物菌質體之菟絲子外表型態差異觀察

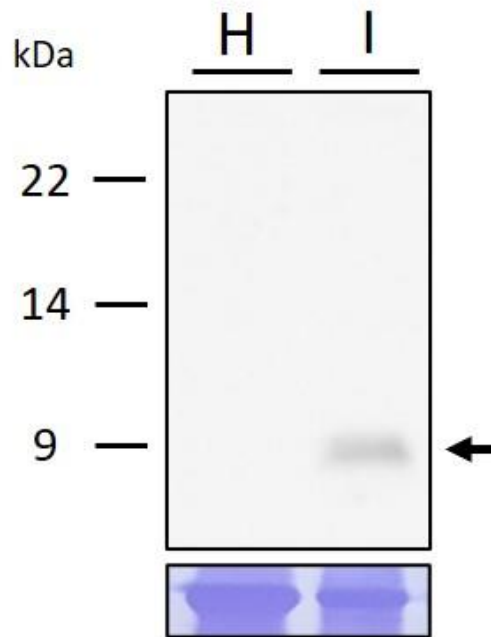
已知除了宿主的水分與養分，同時宿主體內部分物質也會透過吸器進入菟絲子，包含蛋白質、遺傳物質及病原菌等。由於植物菌質體為絕對寄生之植物病原菌，僅能生存於植物篩管內，無法單獨培養生長，因此本實驗將健康菟絲子之新鮮枝條置於感染植物菌質體植株上，使其寄生，讓宿主篩管內的植物菌質體藉由吸器進入菟絲子體內。觀察發現，寄生於受菌質體感染宿主之菟絲子，呈團狀、整體並無明顯水平蔓延現象(圖三、A, B)，而分岔處有3個以上的多分支狀枝條，且枝條長度明顯較短(圖三、C-E)。



圖三、寄生於感病絲瓜並出現病徵之菟絲子。(A,B)菟絲子寄生於植物菌質體感染之絲瓜的狀況。紅圈處為多分支；(C-E)感病菟絲子分支處。

四、鑑定感病菟絲子內植物菌質體之 SP1 蛋白表現

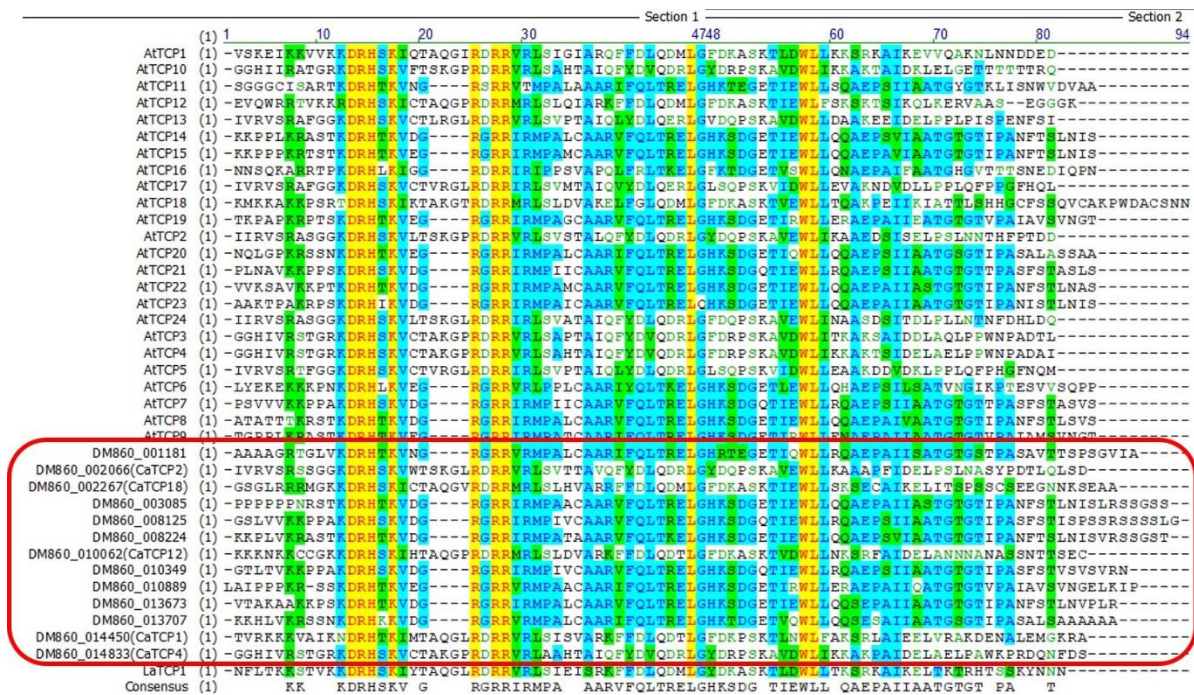
已知植物菌質體會分泌 SP1 蛋白至宿主細胞中，使宿主出現多分支等病徵。本實驗利用抗 SP1 蛋白之專一性多株抗體進行西方墨點法，測定寄生於健康植物以及感病絲瓜且出現病徵之菟絲子體內是否有植物菌質體 SP1 蛋白的表現。由圖四可知，寄生感病絲瓜之菟絲子內可以偵測到 SP1 蛋白。相對的，寄生於健康植物之菟絲子則無法偵測到 SP1 蛋白的存在。



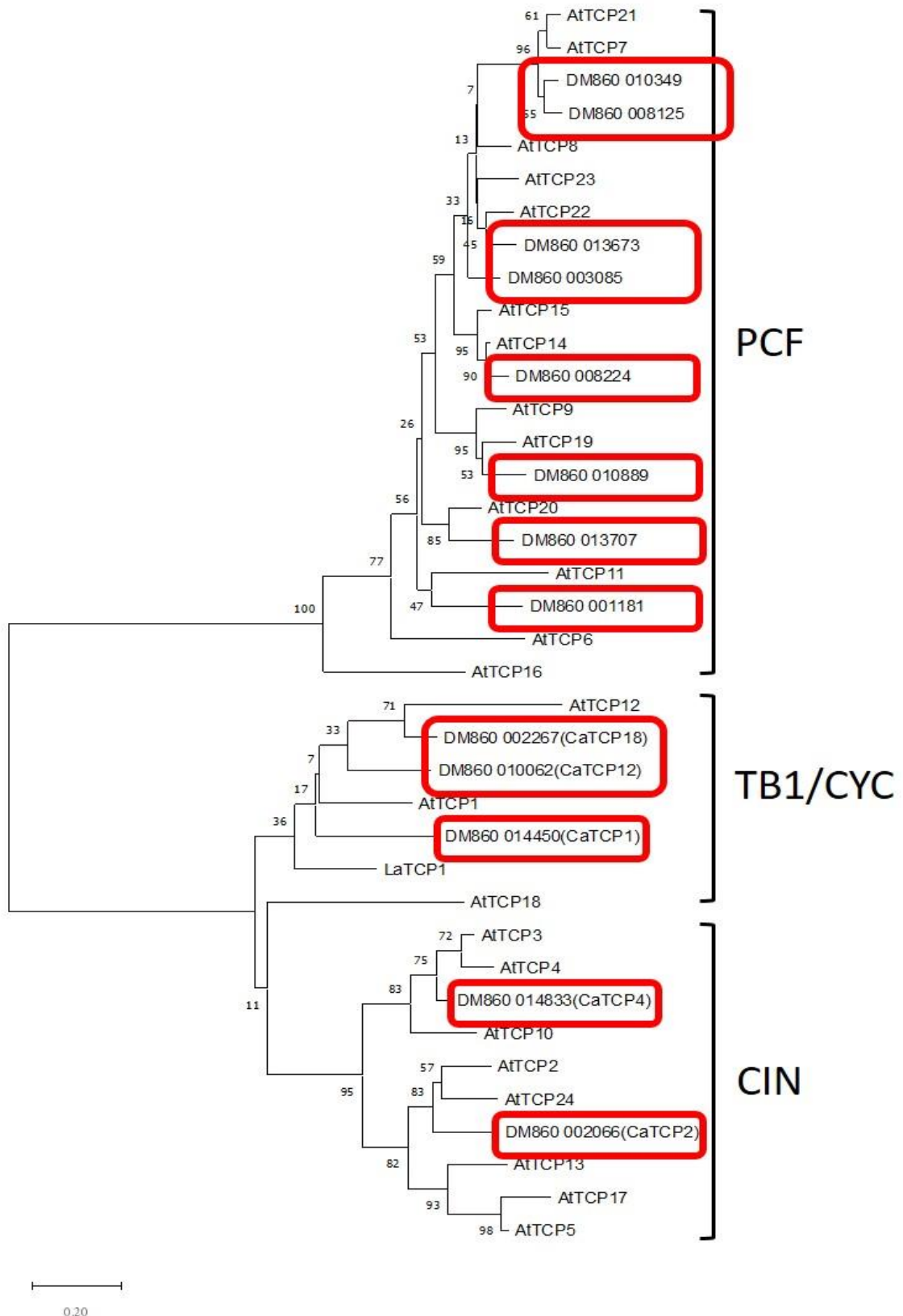
圖四、感病菟絲子體內植物菌質體 SP1 蛋白表現檢測。透過西方墨點法，電泳結果上方為利用抗 SP1 蛋白之專一性多株抗體(濃度為 1/10000)偵測寄生於健康植物之菟絲子(H)及感病絲瓜之菟絲子(I)。箭頭處為 SP1 蛋白(9.3 kDa)。下方則以 Coomassie Brilliant Blue 染色之 Rubisco 蛋白作為對照組(loading control)。

五、莧絲子 TCP 轉錄因子之親緣演化分析

本研究搜尋 NCBI 莧絲子基因組資料庫，發現平原莧絲子(*C. campestris* Yunck.)有 13 個 TCP 轉錄因子（依學名簡稱 CaTCP）。利用 Vector NTI 分析軟體將 CaTCP 轉錄因子、部分阿拉伯芥 TCP 轉錄因子(AtTCP)及絲瓜 TCP1(LaTCP1)之胺基酸序列進行多重序列比對，找出序列保留性區域(TCP domain)（圖五）。再利用 MEGA-X 軟體比對 TCP domain 序列相似度並進行親緣演化分析，得到 TCP 轉錄因子親源演化樹（圖六）。由圖六可知，雖然莧絲子因為基因流失，只剩 13 個 TCP 轉錄因子(約阿拉伯芥 TCP 轉錄因子的一半)，但仍然可分成 PCF、TB1/CYC、CIN 群。其中，TB1/CYC 群中有 *CaTCP1*、*CaTCP12*、*CaTCP18*；CIN 群有 *CaTCP2*、*CaTCP4*；PCF 群則有 8 個 *CaTCP*（因 PCF 群之不同物種間 TCP 轉錄因子功能差異極大，本研究無法確認其調控莧絲子之性狀為何，因此非本研究實驗目標，故無進一步編號）。



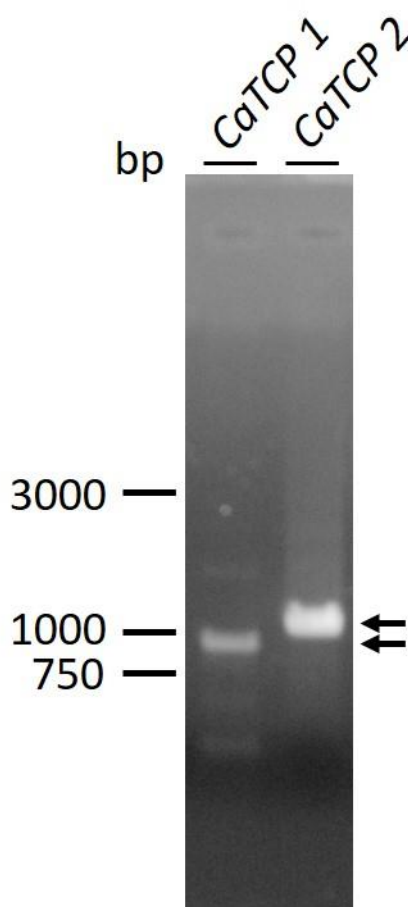
圖五、利用 Vector NTI 進行 AtTCP、CaTCP 及 LaTCP1 之 TCP domain 胺基酸序列比對。圖中顯示為高度序列保留性之 TCP domain。其中，AtTCPs 為阿拉伯芥之 TCP；紅框處，DM860_001181~ DM860_014833 為莧絲子之 TCP；LaTCP1 為絲瓜之 TCP1。相同序列之胺基酸以底色標示並對齊。



圖六、TCP 轉錄因子演化分析。利用 MEGA-X 軟體將圖五所得之 TCP domain 進行序列相似度分析，並畫出親緣演化樹。紅框處為菟絲子之 TCP。分岔處數字代表可信度，水平距離代表序列差異度。

六、菟絲子 *CaTCP1* 與 *CaTCP2* 基因表現與分子選殖

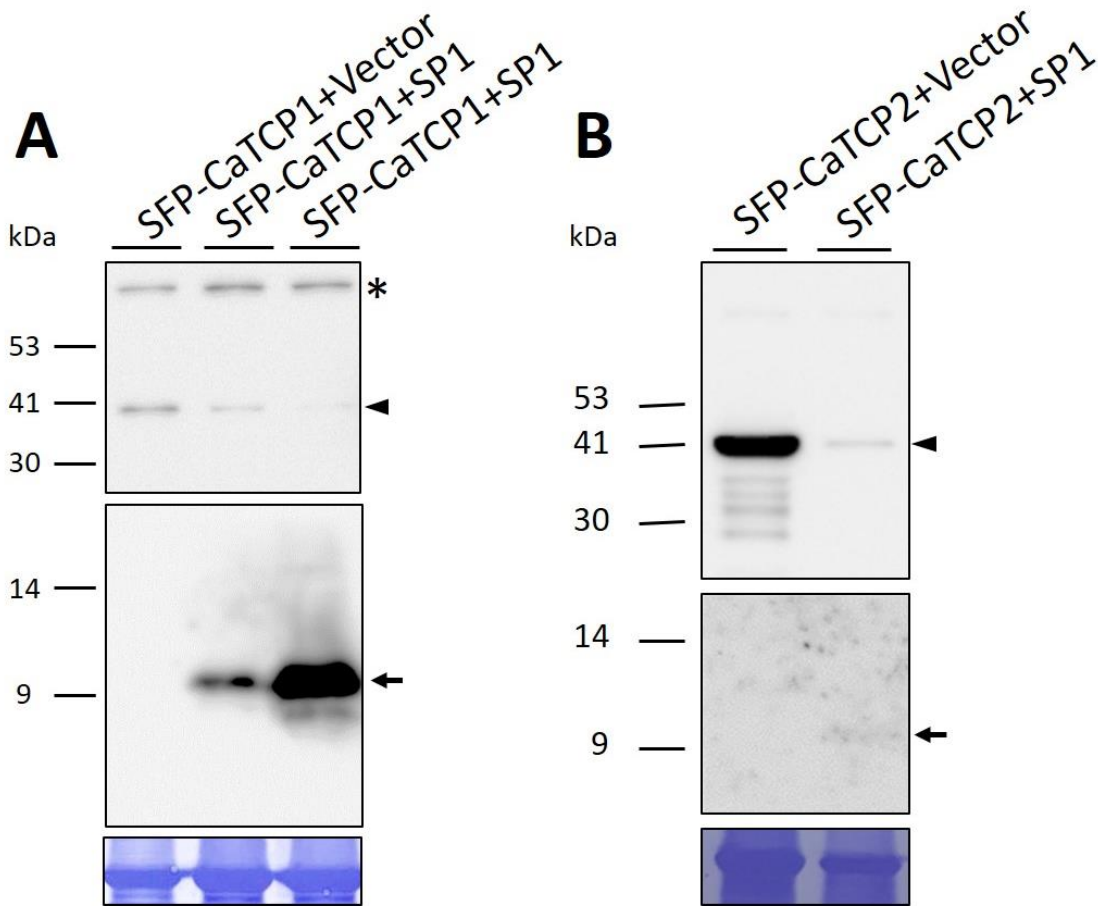
本實驗針對菟絲子 TB1/CYC 和 CIN 群之 *CaTCPs* 進行分子選殖。萃取菟絲子之 RNA 後，利用反轉錄酶合成互補 DNA(cDNA)，並利用設計之引子擴增目標序列（引子序列見附錄二）。結果可知 *CaTCP1* 及 *CaTCP2* 基因具表現量，且成功擴增之 DNA 片段大小符合預期（圖七）。進一步將 *CaTCP1* 及 *CaTCP2* 裝載入植物表現載體 pBA-N-SFP 並進行 DNA 定序確認。然而，在本實驗中未能成功選殖 TB1/CYC 和 CIN 群之 *CaTCP4*、*CaTCP18* 及 *CaTCP12*，故未將該結果列於圖中。



圖七、菟絲子 *CaTCP1* 與 *CaTCP2* 基因表現與分子選殖。以設計之引子及菟絲子 cDNA 模板進行 PCR 擴增，以增幅 *CaTCP1* 和 *CaTCP2* 之 DNA 片段。箭頭處由上至下分別為 *CaTCP2*(1068 bp)及 *CaTCP1*(966 bp)。

七、植物菌質體 SP1 蛋白降解 CaTCP1 及 CaTCP2 之檢測

本實驗利用農桿菌浸潤法，將分別帶有菟絲子 *TCP* 基因及植物菌質體 *SP1* 基因序列之農桿菌感染菸草，使其同時表現菟絲子 *TCP* 蛋白及植物菌質體 *SP1* 蛋白。接著，利用西方墨點法偵測其外源蛋白表現量。由圖八(A)可知 CaTCP1 表現量會因 *SP1* 蛋白表現而降低；且 *SP1* 蛋白表現量愈高，CaTCP1 之降解程度越高；圖八(B)可以明顯看到 CaTCP2 表現量會因 *SP1* 蛋白表現而降低。綜合以上實驗結果可知植物菌質體 *SP1* 蛋白具有降解 CaTCP1 及 CaTCP2 的能力。



圖八、西方墨點法確認 CaTCP1 及 CaTCP2 是否能被 SP1 蛋白降解。(A)CaTCP1 與 SP1 蛋白之表現結果，角形符號為 TCP1 蛋白(35.7 kDa)，箭頭處則為 SP1 蛋白(9.3 kDa)，星號則為不專一訊號；(B)CaTCP2 與 SP1 蛋白之表現結果，角形符號為 CaTCP2(39.5kDa)，箭頭處則為 SP1 蛋白(9.3 kDa)。本實驗表現之 CaTCP1 及 CaTCP2 為 N 端 FLAG 之融合蛋白，可利用 α -FLAG(濃度為 1/5000)偵測。而偵測 SP1 蛋白所用專一抗體濃度為 1/10000。Vector 為空載體(pBA-N-SFP)，作為負對照組。電泳結果下方則以 Coomassie Brilliant Blue 染色之 Rubisco 蛋白作為對照組(loading control)。

陸、討論

一、感病菟絲子與健康菟絲子之外表性狀差異

相較於健康菟絲子的分枝處具有二到三個枝條（圖一），感染植物菌質體之菟絲子分岔處呈叢狀，具有多個枝條，且長度較短（圖三）。此觀察得知感染植物菌質體之菟絲子，其向外蔓延與附著之能力下降，且較不易開花。

二、植物菌質體 SP1 蛋白使感病菟絲子出現病徵

已知不同種類間植物菌質體之不同分泌蛋白所調控的植物性狀有所差異，其中，經由文獻得知絲瓜菌質體之 SP1 蛋白能使絲瓜出現簇葉、多分支及部分觸鬚轉變成葉子等病徵（簡，2020）。由於菟絲子不具有葉，但其卷鬚狀的莖與絲瓜的觸鬚構造類似，都具有攀爬捲曲的功能，所以本研究利用絲瓜菌質體感染菟絲子，並觀察到感病菟絲子出現了多分支與莖短化的病徵，因此推測菌質體 SP1 蛋白具有影響菟絲子內調控相關性狀因子的能力。

三、菟絲子 TCP 轉錄因子家族分析與分子選殖

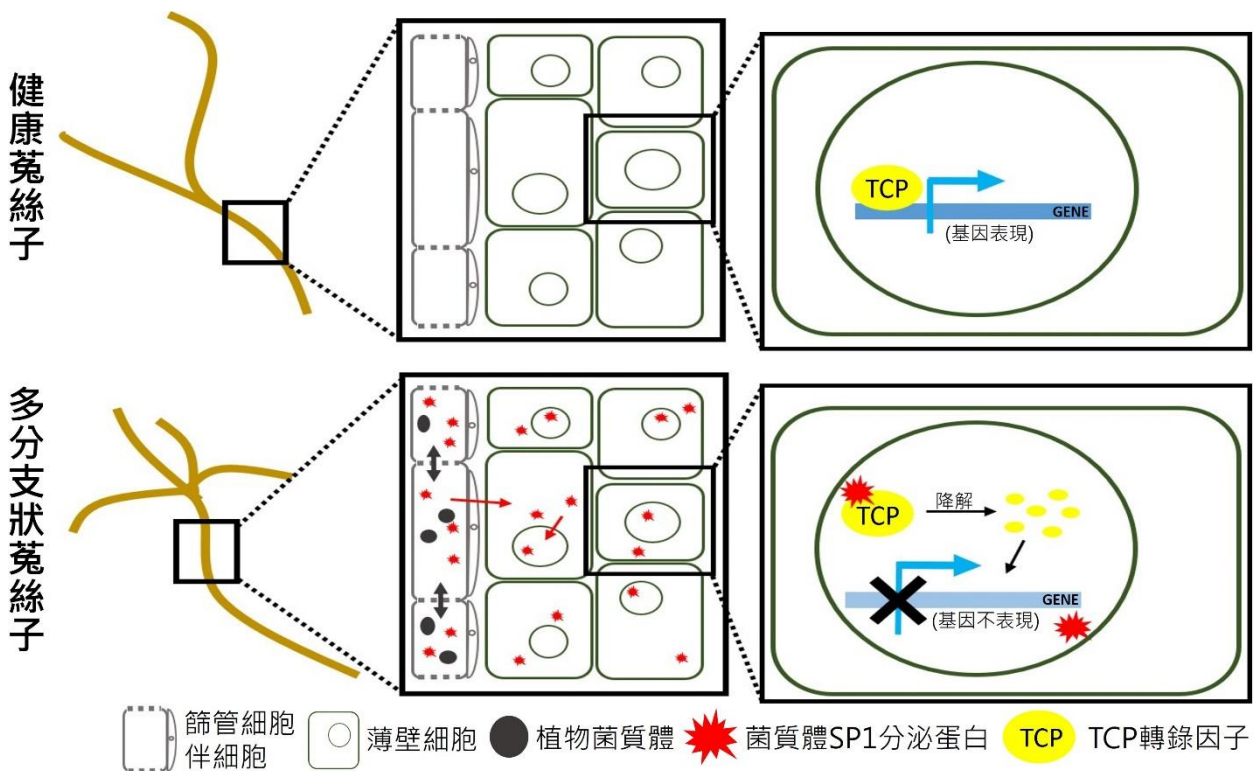
TCP 轉錄因子分成三大群，分別是 PCF、TB1/CYC 及 CIN。雖然菟絲子只剩 13 個 TCP 轉錄因子（約阿拉伯芥 TCP 轉錄因子的一半），但圖六顯示菟絲子的 TCP 轉錄因子仍然有分群的現象。其中，已知 PCF 群的 TCP 在不同物種間所調控之性狀差異大，沒有規律性，所以不是本研究探討對象。而由圖六中也可看到，CIN 群的菟絲子 TCP 基因只剩兩個，與 PCF 群和 TB1/CYC-TCP 群比較，是基因流失最多的一群。已知 CIN-TCP 主要調控葉片的細胞分裂，然而菟絲子不具有葉，故推測此為基因流失的主要原因；相較之下，菟絲子在 TB1/CYC 群的 TCP 數量並無減少。已知 TB1/CYC 群 TCP 與植物分支發育有關，因此推測此群 TCP 轉錄因子可能在菟絲子生長發育中扮演重要的功能。

四、菟絲子 CaTCP1 及 CaTCP2 受植物菌質體 SP1 蛋白降解

由西方墨點法可以確認菟絲子 CaTCP1 會被植物菌質體 SP1 蛋白降解（圖八，A），且 SP1 蛋白表現量與 TCP 降解量成正相關，故感病菟絲子產生之多分支現象應是 CaTCP1 被 SP1 蛋白降解所造成，當 SP1 蛋白表現量越高，CaTCP1 受 SP1 蛋白降解程度也越大；已知屬於 CIN 群 TCP 轉錄因子的 TCP2 可透過調控植物細胞週期以控制葉片發育的大小，本研究確認 CaTCP2 會被 SP1 蛋白降解（圖八，B），雖然菟絲子並沒有葉，但本研究觀察到感病菟絲子出現了莖短化的病徵，已知植物的卷鬚為葉子特化而來，因此本研究推測 CaTCP2 藉由調控菟絲子的細胞週期導致其卷鬚狀的多分支且莖短化現象。

柒、結論

已知植物菌質體在受感染植物之篩管細胞間移動，同時會分泌 SP1 蛋白。當 SP1 蛋白進入植物細胞後，會降解細胞核中的 TCP 轉錄因子，使其失去調節下游基因表現之功能，進而導致感病植物型態發生改變。本研究觀察發現感染植物菌質體之平原菟絲子(*C. campestris* Yunck.)出現多分支及莖短化等病徵，且較健康菟絲子不易蔓延至其他個體。經實驗確認植物菌質體 SP1 蛋白能分泌並降解平原菟絲子 CaTCP1 及 CaTCP2 轉錄因子。本研究歸納出菟絲子調控分支相關性狀的分子機制(圖九)。推測此降解作用可能影響了與菟絲子細胞週期及分支相關基因的表現，使菟絲子出現多分支及莖短化的病徵。因此，若能抑制菟絲子內 CaTCP1 及 CaTCP2 的表現，便能改變菟絲子的性狀，影響其蔓延及攀附的能力。本研究未來將依此結果找尋最佳的菟絲子防治方法。



圖九、植物菌質體改變菟絲子性狀之作用分子機制示意圖。上方為健康菟絲子，其基因表現正常；下方為感染植物菌質體之菟絲子，TCP 轉錄因子被菌質體 SP1 分泌蛋白降解而無法調控下游基因表現，使菟絲子出現多分支及莖短化的病徵。

捌、未來展望

本研究確認植物菌質體 SP1 蛋白能降解平原菟絲子 CaTCP1 及 CaTCP2 轉錄因子，並使平原菟絲子出現多分支及莖短化的病徵，降低菟絲子向外擴展的能力。後續可嘗試利用基因靜默技術，設計具有專一性的 micro RNA，利用病毒表現系統，在病毒感染菟絲子後，於菟絲子體內大量製造專一性 micro RNA，並靜默菟絲子的 *TCP1* 及 *TCP2* 基因。此法不僅能使菟絲子出現病徵，改變其擴散能力，對於植物宿主也不會有影響，藉以達到防治菟絲子的目的。

玖、參考資料及其他

一、參考資料

- (一) 陳富永、蔣慕琰 (2004)。菟絲子炭疽病菌寄主範圍與致病力探討。農委會台南區農業改良場。中華民國雜草學會會刊，25 (2)，69-82。
<https://www.tactri.gov.tw/Uploads/Item/bdc1bf0b-d949-4407-9fec-4cafaa0f1532.pdf>
- (二) 簡源佑 (2020)。16SrII 群植物菌質體中間寄主之鑑定與絲瓜簇葉病菌質體分泌性蛋白 SAP11 致病分子機制探討。國立中興大學生物化學研究所碩士論文。
<https://hdl.handle.net/11296/32g779>
- (三) 劉秀玲、陳武揚、林長平 (2004)。重要植物菌質體病害之診斷及鑑定- 梨衰弱病及翠菊黃萎病。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊 (五)。
<https://www.baphiq.gov.tw/userfiles/51.pdf>
- (四) 謝玉貞、林芳妘、蔣慕琰、袁秋英 (2012)。利用 ISSR 分子標誌鑑定臺灣菟絲子屬植物。中華民國雜草學會會刊，33 (1)，13-26。
<https://www.tactri.gov.tw/Uploads/Item/bb861e5b-b9cd-41a2-a371-a7d5410d5162.pdf>
- (五) Sun, G., Xu, Y., Liu, H., Sun, T., Zhang, J., Hettenhausen, C., Shen, G., Qi, J., Qin, Y., Li, J., Wang, L., Chang, W., Guo, Z., Baldwin, I., and Wu, J. (2018) Large-scale gene losses underlie the genome evolution of parasitic plant *Cuscuta australis*. *Nat Commun* 9, 2683.
- (六) Sugio, A., MacLean, A. M., Kingdom, H. N., Grieve, V. M., Manimekalai, R., and Hogenhout, S. A. (2011) Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology* 49, 175-195.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21838574/>
- (七) Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., and Coen, E. (1999) The TCP domain: a motif found in

proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* 18, 215-222.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10363373/>

(八) Vogel, A., Schwacke, R., and Denton, A. K. (2018) Footprints of parasitism in the genome of the parasitic flowering plant *Cuscuta campestris*. *Nat Commun* 9, 2515.

<https://www.nature.com/articles/s41467-018-04344-z>

(九) Weng, Y. Y., Liou, W. C., Chien, Y., Liao, P. Q., Wang, C. J., Chiu, Y. C., Chen, Y. K., and Yang, J. Y. (2021) First Report of 16SrII-V Peanut Witches' Broom Phytoplasma in Snake Gourd (*Trichosanthes cucumerina* L.) in Taiwan. *Plant J.* First look.

<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2666-PDN>

(十) Zheng, K., Ni, Z., Qu, Y., Cai, Y., Yang, Z., Sun, G., and Chen, Q. (2018) Genome-wide identification and expression analyses of TCP transcription factor genes in *Gossypium barbadense*. *Sci Rep* 8, 14526. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-32626-5>

二、附錄

(一) UBC 823 之引子序列

<i>UBC 823</i>	Forward	5' - TCTCTCTCTCTCTCC -3'
	Reverse	5' - GGAGAGAGAGAGAGAGA -3'

(二) 菟絲子 *tcp* 基因之引子及切位酵素

<i>Catcp1</i>	Forward	5' -ACTG <u>GGATCC</u> ATGTTCTCTTCACCGATTCAAAC -3'
	Reverse	5' -CTAG <u>ACGCGT</u> TTAATTCGGAGAGAGCATATAGAT-3'

質體：pBA-N-SFP；切位酵素：*BamHI/MluI*

<i>Catcp2</i>	Forward	5' -ACTG <u>GGATCC</u> ATGGAGGTTGAAAACCCAAGAATC-3'
	Reverse	5' -CTAG <u>ACGCGT</u> TCAGTTCTTCCCTTGTGCTTATG-3'

質體：pBA-N-SFP；切位酵素：*BamHI/MluI*

<i>Catcp4</i>	Forward	5' -ACTG <u>GGATCC</u> GGGGAGAATCGTCAGCAGAGG-3'
	Reverse	5' -CTAG <u>GAGCTC</u> TTAACGGCGGGAATCAGAGGAAGC-3'

質體：pBA-N-SFP；切位酵素：*BamHI/SacI*

Catcp12 Forward 5' -ACTG GGATCC ATGTATCCCTTTATATACAATGCT-3'
Reverse 5' -CTAG ACGCGT TCATAGATTCCCATTGCTGTAGCC-3'

質體：pBA-N-SFP；切位酵素： *Bam*H1/*Mlu*1

Catcp18 Forward 5' -ACTG GGATCC ATGTTTTCCCAAACAACAACCCT-3'
Reverse 5' -CTAG ACGCGT TCAAAATGGAGCCATCTCCCAATTC-3'

質體：pBA-N-SFP；切位酵素： *Bam*H1/*Mlu*1

(三) 蛇瓜鑑定結果封面截錄

1	Disease Note
2	First Report of 16SrII-V Peanut Witches' Broom Phytoplasma in Snake
3	Gourd (<i>Trichosanthes anguina</i>) in Taiwan
4	Yi-Ying Wong¹, Wei-Gon Liao¹, Yuan-Yu Chien², Pei-Qing Liao², Chien-Jui Wang², Yi-
5	Shing-Shin², Yuh-Kun Chen³ and Jun-Yi Yang^{2,4†}
6	
7	
8	Authors and Affiliations
9	¹ National Taichung Girls Senior High School, Taichung 403, Taiwan
10	² Institute of Biochemistry, National Chang Hsing University, Taichung 403,
11	Taiwan
12	³ Department of Plant Pathology, National Chang Hsing University, Taichung
13	403, Taiwan
14	⁴ Advanced Plant Biotechnology Center, National Chang Hsing University,
15	Taichung 402, Taiwan
16	
17	
18	
19	† Corresponding author:
20	Jun-Yi Yang
21	Institute of Biochemistry, National Chang Hsing University, 250
22	Kuokuang Road Taichung 40227, Taiwan
23	886-4-22846468 ext. 252 (Tel.), 886-4-22855487 (Fax)
24	jjyang@nchu.edu.tw
25	
26	

【評語】 052206

1. 本研究之重要發現為：菟絲子 CaTCP1/ CaTCP2 會被植物菌質體 SP1 蛋白降解，且 SP1 蛋白表現量與 TCP 降解量成正相關，故推論感病菟絲子產生之多分支現象應是 CaTCP1/ CaTCP2 被 SP1 蛋白降解所造成。這些蛋白質或基因的表現，使菟絲子產生多分支及莖短化的病徵。這些可以提供進一步深入的研究以提供未來防治菟絲子的參考。
2. 整體構想完整，使用之試驗方法適當，所得資料不但在學術上具有價值，在菟絲子防治上亦具有應用之潛力。
3. 實驗結果完整，惟部分實驗缺少對照組，如圖二僅有採集之菟絲子，應有已知種別的菟絲子做為對照組。
4. 作者等在性狀差異上，若能輔以統計調查分析，必能使論文之正確性更佳。
5. 本文作者文筆流暢，寫作大部分能符合科學論文之規定，惟參考文獻中之英文文獻部分，未依作者字母順序排列，宜加以修正。

作品簡報

中華民國第61屆中小學科學展覽會

作品名稱：**利用植物菌質體探討菟絲子的蔓延與攀附**

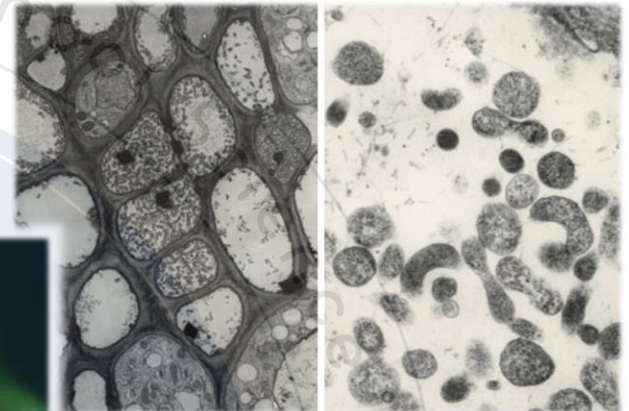
組 別：高中職組

科 別：農業與食品學科

研究介紹及動機



▲ 菟絲子卷鬚狀枝條



▲ 植物篩管細胞內之菌質體



▲ 菟絲子寄生情形



▲ 菟絲子吸器構造



▲ 感病杜鵑之簇葉及多分支病徵

圖一、菟絲子與植物菌質體介紹

1. 植物菌質體 (phytoplasma) 是否可以使菟絲子出現類似感病杜鵑之多分支病徵?
2. 若感病菟絲子出現病徵，那麼菟絲子調控相關性狀因子之作用機制為何?

圖片來源:

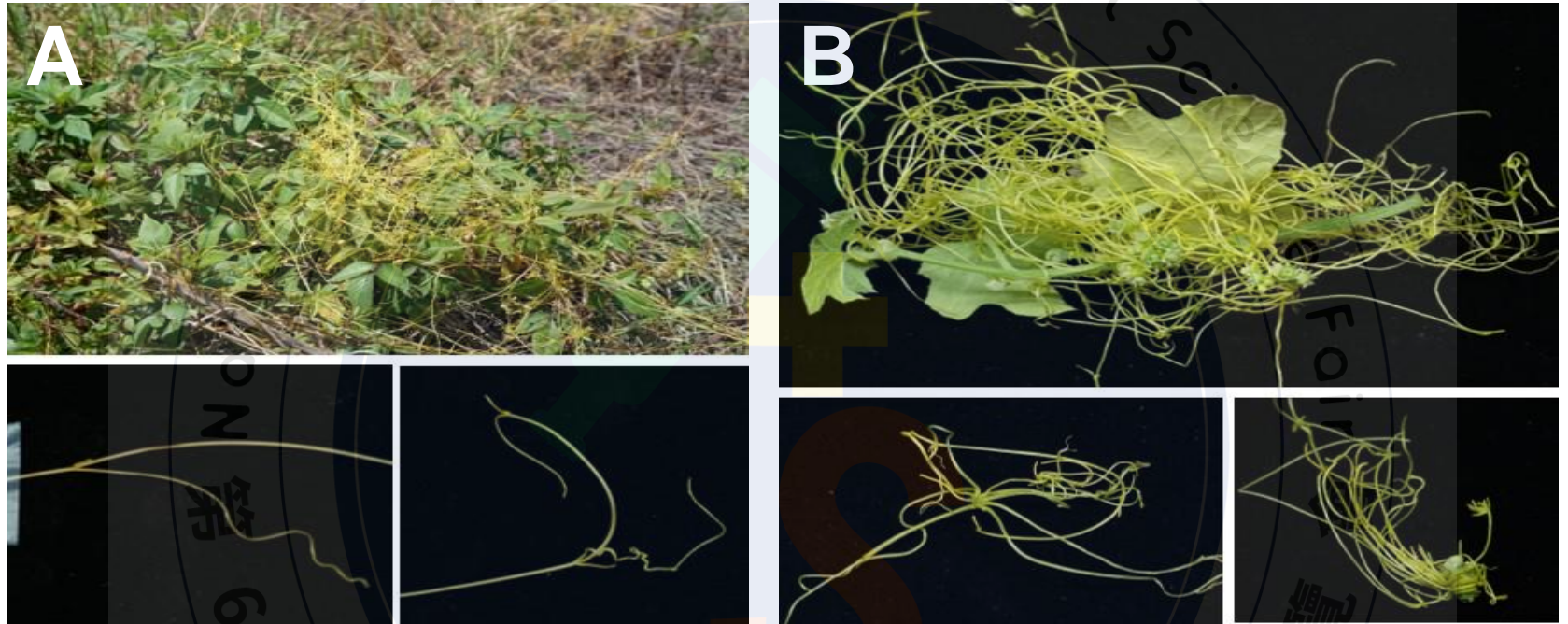
菟絲子: <https://www.treehugger.com/dodder-vine-plant-communication-4868422> <https://www.dreamstime.com/stock-photo-dodder-illinois-prairie-genus-cuscuta-parasitic-plant-totally-dependent-other-host-plants-survival-image49282693#res26615551> <https://www.futurity.org/dodder-parasitic-plant-genes-2113902/>

植物菌質體: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-072910-095323> <https://tw.gardenmanage.com/statuses/1000139000.html>

研究方法

- 一. 觀察感染菌質體之菟絲子**型態發育的差異性**。
- 二. 利用**ISSR分子標誌**技術鑑定實驗用**菟絲子之種類**。
- 三. 利用西方墨點法**偵測菟絲子之菌質體SP1蛋白表現**，確認菟絲子之性狀變化與菌質體SP1蛋白之關聯性。
- 四. 菟絲子**TCP轉錄因子(CaTCP)親緣演化分析**，分子選殖平原菟絲子之TB1/CYC和CIN群TCP轉錄因子。
- 五. 利用西方墨點法確認選殖出的平原菟絲子**TCP轉錄因子與菌質體SP1蛋白的作用關係**。
- 六. 綜合以上研究，統整分析調控菟絲子蔓延攀附的分子機制。

研究結果 (一) 田間(A)與感染菌質體(B)菟絲子性狀差異



圖二、菟絲子生長情形及外表性狀

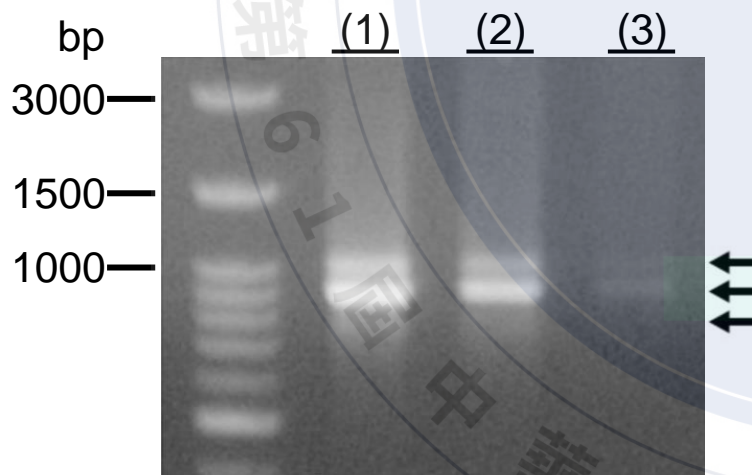
- A為於彰化縣線西鄉採集之田間菟絲子，其寄生情形呈水平方向向四面八方蔓延擴展，分岔處有2~3個枝條，且枝條較為細長，並向外延伸。
- B為感染植物菌質體之菟絲子，整體寄生情形呈團狀，無明顯水平蔓延之現象，分岔處有3個以上的枝條，且枝條長度明顯較健康菟絲子短。

研究結果 (二) 利用ISSR分子標誌技術鑑定菟絲子種類

● ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR)分子標誌鑑定技術：

不同的物種間，不同生物的基因體內會有數個由2-3個核苷酸重複排列的簡單重複性DNA序列(ISSR)。不同物種之ISSR間的序列間隔長度不盡相同，所以，可以透過設計ISSR引子、進行PCR擴增間隔之DNA片段。最後，根據DNA片段大小比對文獻資料，確認菟絲子種類。

● 鑑定結果：



利用UBC823引子擴增之DNA片段(箭頭處)由上至下分別為1100, 900, 800 bp。Lane (1), (2), (3)之gDNA萃取液濃度分別為原液, 10, 1 ng/ μ l。DNA片段大小比對文獻資料，確認種類為平原菟絲子(*C. campestris* Yunck.)，且片段條帶亮度與gDNA濃度成正相關。

圖三、菟絲子之gDNA以UBC 823引子進行PCR擴增序列片段之電泳結果。

研究結果 (三) 檢測菟絲子內SP1分泌蛋白表現

● 植物菌質體之SP1分泌蛋白：

經由文獻得知植物菌質體之SP1蛋白能使植物出現簇葉、多分支等病徵。本研究觀察到感病菟絲子出現了多分支與莖短化的病徵，推測是因SP1蛋白影響菟絲子內調控型態發育相關因子所致。故本研究首先檢測感病菟絲子體內SP1蛋白之表現，以確認SP1與菟絲子出現病徵之關聯性。

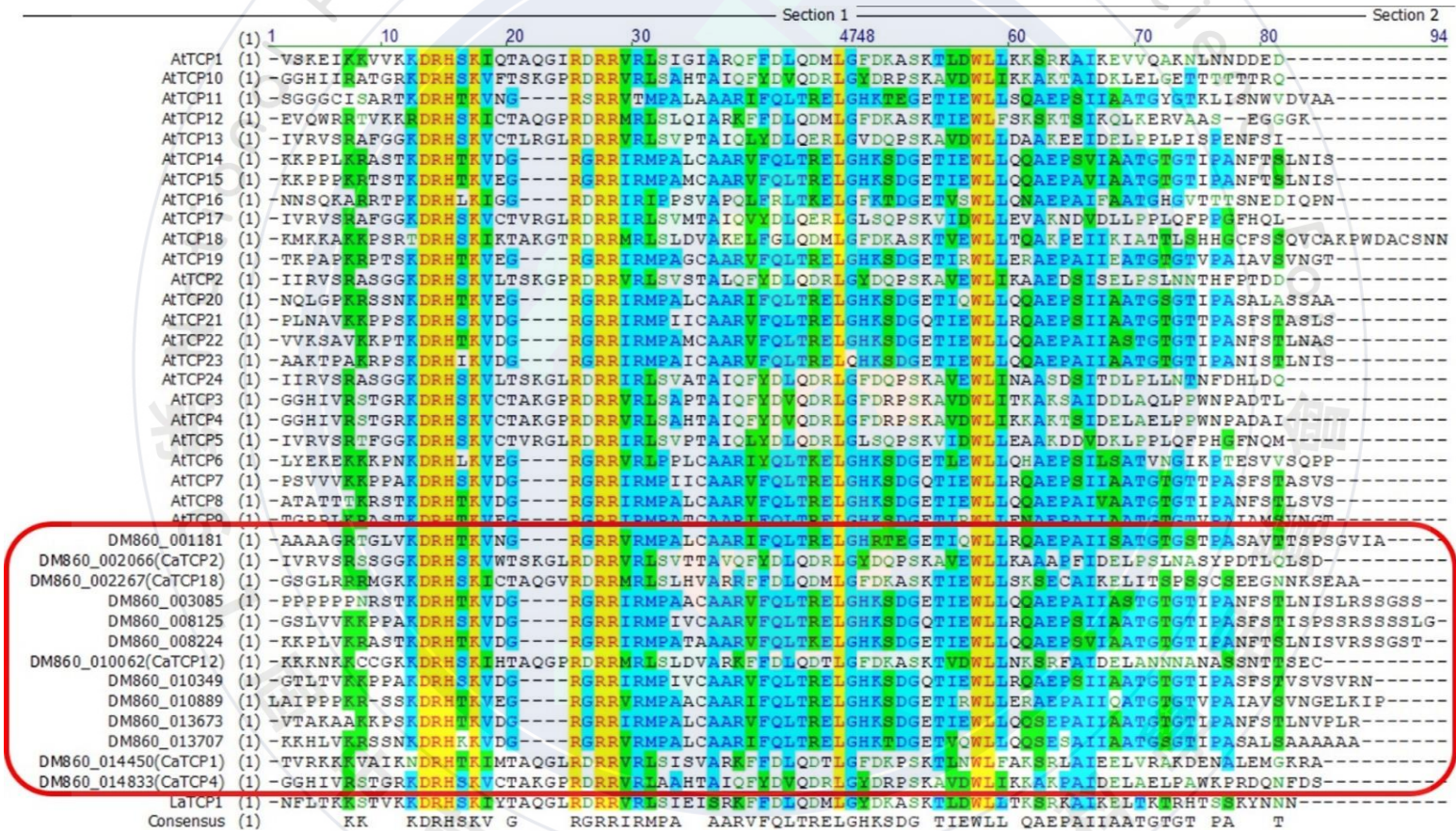
● 檢測結果：



西方墨點法偵測菟絲子體內之菌質體SP1蛋白表現量。由圖四結果可知，在感病菟絲子(I)內可以偵測到SP1蛋白(箭頭處)；健康菟絲子(H)則無法偵測到SP1蛋白表現。

圖四、菟絲子體內植物菌質體的SP1蛋白表現

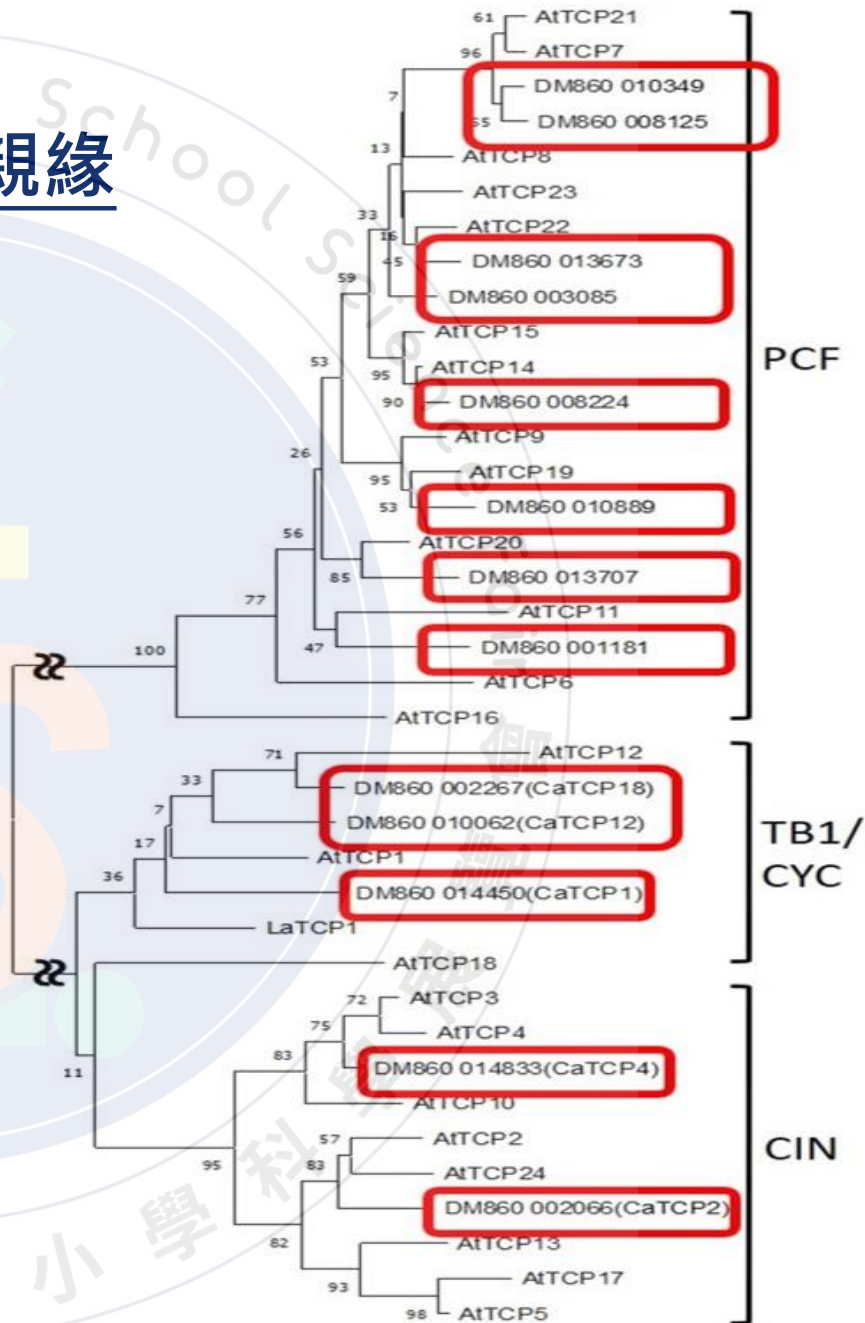
研究結果 (四) TCP轉錄因子親緣演化分析



圖五、將菟絲子TCP轉錄因子與模式植物阿拉伯芥TCP轉錄因子進行多重胺基酸序列比對，找出高度保留性序列(TCP domain)。

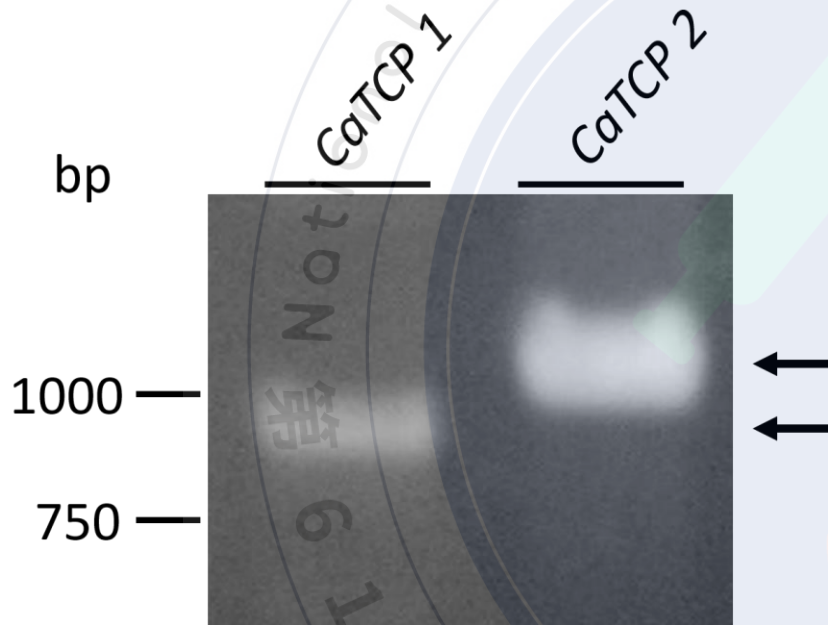
研究結果 (四) TCP轉錄因子親緣 演化分析

利用MEGA-X軟體依照TCP domain相似度高低得到TCP轉錄因子之親緣關係樹(圖六)。其中，CIN群TCP主要調控葉片大小的發育；TB1/CYC群TCP與調控植物分支發育有關，因此本研究針對此二群之TCP進行分子選殖。



圖六、TCP轉錄因子之親緣關係樹

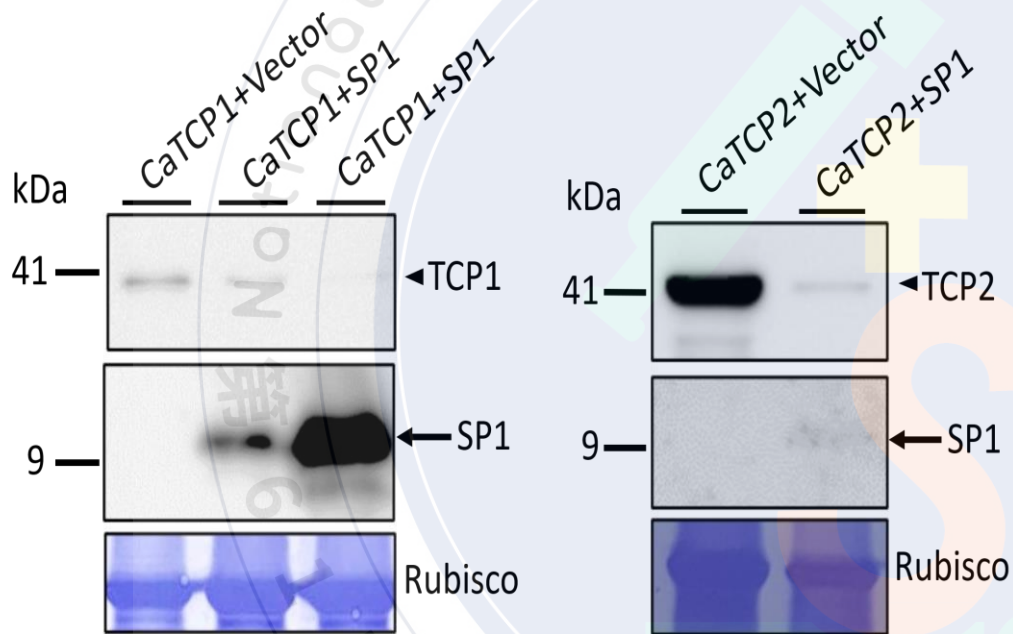
研究結果 (五) 確認菟絲子TCP1及TCP2 基因表現



萃取平原菟絲子之RNA，設計引子，利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 擴增目標基因。根據(圖七)電泳結果，箭頭處由上至下分別為 *CaTCP2* (1068 bp)及 *CaTCP1* (966 bp)與預期符合。進一步接入pBA-N-SFP載體進行DNA定序，確認序列為 *CaTCP1*與 *CaTCP2*基因。

圖七、菟絲子之互補DNA (cDNA)以設計之引子所擴增出片段之電泳結果。

研究結果 (六) SP1蛋白與CaTCPs轉錄因子降解實驗

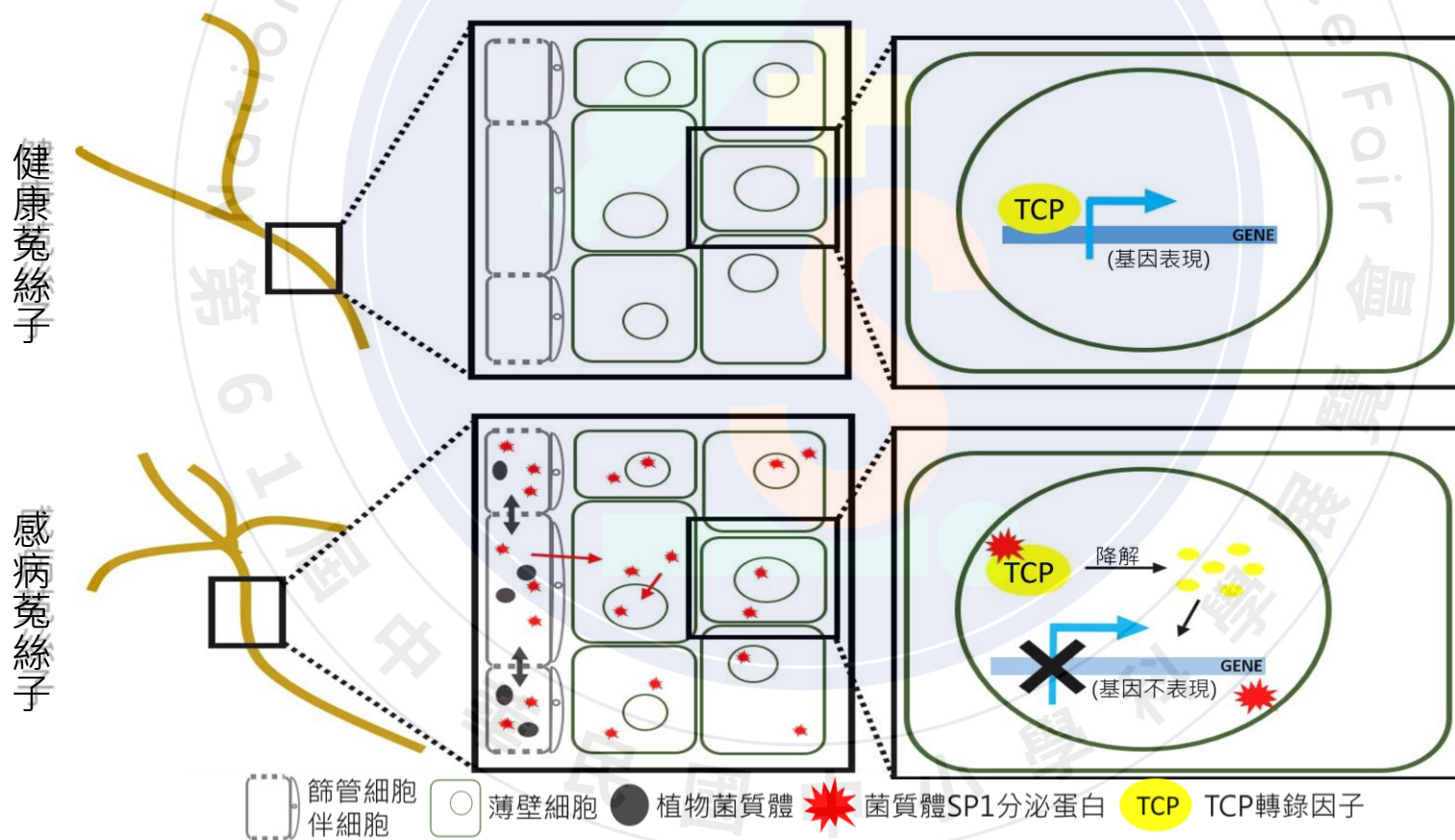


根據(圖八)結果，CaTCP1降解量與SP1蛋白表現量呈正相關；而CaTCP2表現量也因SP1蛋白表現而降低。

圖八、西方墨點法偵測CaTCP1, CaTCP2與SP1蛋白之降解結果。

結論

本研究發現感染植物菌質體之菟絲子會出現**多分枝及莖短化**等病徵，較健康菟絲子不易蔓延至其他個體。經實驗確認**植物菌質體SP1蛋白能降解菟絲子CaTCP1及CaTCP2轉錄因子**，推測由於TCP的降解會造成菟絲子出現多分支及莖短化的病徵。因此，若能控制CaTCP1及CaTCP2在菟絲子內的表現量，便能**改變菟絲子的性狀**，影響其向外蔓延的能力，達到防治菟絲子的效果。



圖九、植物菌質體改變菟絲子分支性狀之作用分子機制示意圖

未來展望

本研究確認植物菌質體 SP1 蛋白能降解平原菟絲子 CaTCP1 及 CaTCP2 轉錄因子，並使平原菟絲子出現多分支及莖短化的病徵，降低菟絲子向外擴展的能力。後續可嘗試利用**基因靜默技術**，使用**病毒表現系統**，在病毒感染菟絲子後，於菟絲子體內大量製造專一性**miRNA/siRNA**，並靜默菟絲子的TCP1及TCP2基因。此法不僅能使菟絲子出現病徵，改變其擴散能力，對於植物宿主也不會有影響，藉以達到防治菟絲子的目的。

參考資料

1. 簡源佑 (2020)。16SrrII 群植物菌質體中間寄主之鑑定與絲瓜簇葉病菌質體分泌性蛋白 SAP11 致病分子機制探討。國立中興大學生物化學研究所碩士論文。 <https://hdl.handle.net/11296/32g779>
2. 謝玉貞、林芳妘、蔣慕琰、袁秋英 (2012)。利用 ISSR 分子標誌鑑定臺灣菟絲子屬植物。中華民國雜草學會會刊，33 (1)，13-26。 <https://www.tactri.gov.tw/Uploads/Item/bb861e5b-b9cd-41a2-a371-a7d5410d5162.pdf>
3. Sun, G., Xu, Y., Liu, H., Sun, T., Zhang, J., Hettenhausen, C., Shen, G., Qi, J., Qin, Y., Li, J., Wang, L., Chang, W., Guo, Z., Baldwin, I., and Wu, J. (2018) Large-scale gene losses underlie the genome evolution of parasitic plant *Cuscuta australis*. *Nat Commun* 9, 2683.
4. Sugio, A., MacLean, A. M., Kingdom, H. N., Grieve, V. M., Manimekalai, R., and Hogenhout, S. A. (2011) Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology* 49, 175-195. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21838574/>
5. Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., and Coen, E. (1999) The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* 18, 215-222. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10363373/>
6. Zheng, K., Ni, Z., Qu, Y., Cai, Y., Yang, Z., Sun, G., and Chen, Q. (2018) Genome-wide identification and expression analyses of TCP transcription factor genes in *Gossypium barbadense*. *Sci Rep* 8, 14526. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-32626-5>