

國立臺灣大學生物資源暨農學院植物病理與微生物學研究所

碩士論文

Department of Plant Pathology and Microbiology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

於圓葉菸草中探討蕙蘭嵌紋病毒與齒舌蘭輪斑病毒之交互作用

Interactions between *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum*

ringspot virus* in *Nicotiana benthamiana

郭尚明

Shang-Ming Guo

指導教授：張雅君 博士

Advisor: Ya-Chun Chang, Ph.D.

中華民國 106 年 6 月

June, 2017



國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

於圓葉菸草中探討蕙蘭嵌紋病毒與齒舌蘭輪斑病毒之
交互作用

Interactions between *Cymbidium mosaic virus* and
Odontoglossum ringspot virus in *Nicotiana benthamiana*

本論文係郭尚明君 (R03633010) 在國立臺灣大學植物病理與微生物學系完成之碩士學位論文，於民國一零六年六月二十九日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

張雅君

(簽名)

(指導教授)

林詩鈞

蔣慶修

系主任、所長

沈得強 (簽名)

誌謝



在 403 實驗室的這三年多來受到許多人的幫助。

首先，感謝指導老師張雅君老師在實驗過程中不斷地鼓勵、給予建言，並提供一個很好的研究環境；此外，時常看到老師忙於撰寫計畫報告，以維持實驗室研究的經費，謝謝老師讓我們可以無憂無慮地進行實驗。其次，感謝口試委員林詩舜老師與蔡慶修老師指導論文的修改，以及在口試時提供許多寶貴意見。

這三年來，多虧了許多熱心學長姊的指導讓我的實驗能順利完成。裕雯、羽萱學姊在實驗初期教導我許多基本的實驗技巧；庭禕學姊常在我實驗失敗、不順利時聽我抱怨；漢麟學長在碩班前兩年給予許多實驗上的建議；威哥在實驗室的儀器操作，以及實驗原理的部分給予很多指導；佑瑋學長則常與我討論實驗的細節，幫助我進行 trouble shooting。

整個碩班生涯，難得有一群同學能在實驗室三年一起待好待滿。小 M、宇昇、勝軒和信輔，不僅是實驗室好夥伴，還是四年的大學同窗，不論是一起討論實驗、討論球賽，還是一起玩樂、喇賽聊天，感謝總是有這一群好朋友的陪伴。學弟妹中，特別感謝思淮、靖益總是在我需要幫忙時熱心協助，以及在最後論文衝刺的時間，感謝陳臻常常陪我到晚上，並協助我許多實驗的進行。在公共事務上，也有賴許多同學、學弟妹們認真負責，維持實驗室的正常運作，非常謝謝他們！

最後感謝我的家人的陪伴，尤其是我母親，提供我生活上的支持，特別是每次中午打開便當時，總是引起實驗室夥伴們驚呼連連。

碩班三年加上大學四年的學生生涯，總算在跌跌撞撞中走到了終點，學習到很多，同時更加了解自己的不足。感謝這一路上幫助我的人們，僅以此文聊表謝意。

中文摘要

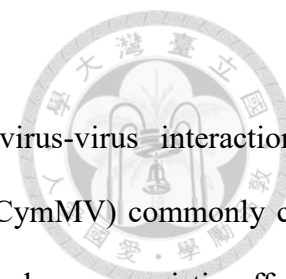


植物病毒共同感染於相同寄主時，常會產生交互作用。齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)與蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)複合感染至蘭花時，往往會造成較單獨感染更為嚴重的病徵，此病徵加劇的現象稱為協力作用(synergistic effect)。本實驗室於圓葉菸草(*Nicotiana benthamiana*)系統中發現，ORSV 與 CymMV 複合感染於菸草原生質體時，仍保有協力作用，且 ORSV 似乎透過具有基因靜默抑制功能之 p126 蛋白調控與 CymMV 的協力作用。本研究延續兩病毒於圓葉菸草中之試驗，以農桿菌接種法接種 CymMV 與 ORSV 之其他蛋白，發現除了 p126 外，鞘蛋白也會使 CymMV 的累積量上升，但機制仍不清楚。ORSV p126 的四個功能區單獨存在時，已被證明均不具有基因靜默抑制能力；而本研究構築出不同功能區組合的 p126 蛋白，發現缺少任一功能區者，亦無法抑制植物之基因靜默。將 ORSV 與 CymMV 複合接種於菸草中，發現在接種葉的病毒累積量上無法觀察到兩者有協力作用產生；但透過罹病組織之汁液接種，在接種葉與系統葉均可觀察到較明顯且嚴重的病徵。利用間接式酵素免疫吸附法(I-ELISA)測定，發現原本無法移動至系統葉之 CymMV 可成功感染至系統葉，顯示雖然在病毒累積量上無協力現象，但在移動能力上 ORSV 仍可協助 CymMV。若將 CymMV 與失去系統性移動能力之 ORSV^{E100A} 複合感染，則此協力現象消失，顯示 CymMV 之系統性移動可能倚賴 ORSV 之 CP 或 ORSV 之感染過程。欲了解 CymMV 受 ORSV 協助的情形是否具有專一性，嘗試共表現 CymMV 與 *Turnip mosaic virus* (TuMV) HCPro、*Cucumber mosaic virus* (CMV) 2b、*Potato virus X* (PVX) p25 及 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) p19 等已知的病毒基因靜默抑制子。結果顯示，除 PVX p25 幫助 CymMV 的效應較不明顯外，其餘基因靜默抑制子均可顯著地提升 CymMV 累積量，顯示在病毒累積量上 p126 協助 CymMV 的情形並不具有專一性。然而在系統性移

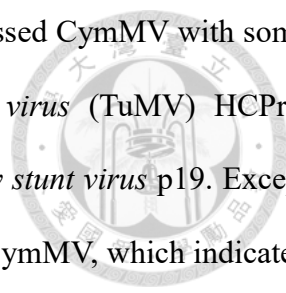
動上，TuMV、PVX 及隸屬於 *Tobamovirus* 屬之 *Tomato mild green mosaic virus* (TMGMV)均可協助 CymMV 移動至系統葉。在 TuMV+CymMV 與 PVX+CymMV 複合感染時，分別有 57%及 50%的植株在系統葉上偵測到 CymMV；而在 TMGMV+CymMV 複合感染植株中，CymMV 均可系統性感染。最後，本實驗構築出可表現明顯綠色螢光之 CymMV-eGFP 螢光病毒株，並利用該材料驗證在病毒累積量與系統性移動上所觀察到的現象。

關鍵字：齒舌蘭輪斑病毒、蕙蘭嵌紋病毒、協力作用、基因靜默抑制、GFP 螢光病毒株

Abstract



Mixed infection of plant viruses usually leads to intrahost virus-virus interactions. *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) commonly co-infect orchid plants and cause more severe symptoms, which is defined as synergistic effect. Recently, we found that the synergistic effect between ORSV and CymMV did exist on *Nicotiana benthamiana* protoplasts. This interaction seems to be regulated by the silencing suppression activity of ORSV p126. In this study, we continued to explore the interactions between ORSV and CymMV on *N. benthamiana*. In addition to p126, transiently expressed ORSV capsid protein (CP) facilitated CymMV accumulation on the inoculated leaves of *N. benthamiana*, but ORSV movement protein did not. The mechanism under this phenomenon remains unknown. Individual domains of ORSV p126 were proved without RNA silencing suppression ability and could not improve CymMV accumulation. In this study, we constructed five different domain combination of p126 and found that all four domains are necessary for RNA silencing suppression. Surprisingly, viral RNA and CP accumulation of both ORSV and CymMV had no significant difference between singly and doubly inoculated leaves of *N. benthamiana* plants through agroinoculation. However, by means of sap inoculation, more severe symptoms on both inoculated and systemic leaves of doubly infected plants were observed compared to singly infected ones. Next, we detected the viruses in systemic leaves of ORSV and CymMV doubly infected plants by indirect-ELISA, and found that the systemic movement-deficient CymMV could systemically infect *N. benthamiana*. These results suggested that although mixed infection of ORSV and CymMV did not exhibit synergistic interaction on inoculated leaves, ORSV still facilitated CymMV in other mechanism, probably on movement. Interestingly, facilitation on CymMV systemic movement disappeared when CymMV was co-inoculated with systemic movement-deficient ORSV (ORSV^{E100}), which suggested the systemic movement of CymMV may rely on ORSV CP or ORSV infection processes.



To understand the specificity of ORSV-CymMV synergism, we co-expressed CymMV with some well-known RNA silencing suppressors (RSSs), e.g. *Turnip mosaic virus* (TuMV) HCPro, *Cucumber mosaic virus 2b*, *Potato virus X* (PVX) p25 and *Tomato bushy stunt virus* p19. Except for PVX p25, all RSSs could significantly increase the accumulation of CymMV, which indicated that p126-mediated enhancement of CymMV accumulation probably can be replaced by other RSSs. Furthermore, we were curious about whether CymMV can systemically infect *N. benthamiana* with the aid of other ORSV-related or ORSV-unrelated viruses. For mixed infection of TuMV+CymMV, and PVX+CymMV, about 57% and 50% infected plants showed systemic CymMV infection. Co-infection of CymMV and *Tomato mild green mosaic virus* (TMGMV), a tobamovirus, facilitated systemic movement of CymMV on all tested plants. Finally, we constructed three eGFP-expressing CymMV clones and used one of them to confirm the experimental results.

Key words: *Odontoglossum ringspot virus*, *Cymbidium mosaic virus*, RNA silencing suppression, GFP-expressing virus

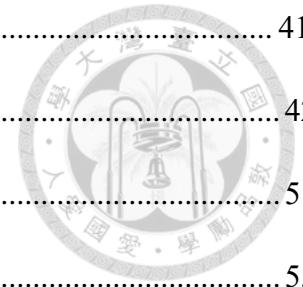
目錄



中文摘要.....	i
Abstract.....	iii
1. 前言.....	1
1.1 植物之防禦反應與病毒基因靜默抑制子.....	1
1.2 植物病毒之交互作用.....	2
1.3 植物病毒之協力作用.....	3
1.4 齒舌蘭輪斑病毒與蕙蘭嵌紋病毒.....	5
1.5 前人研究與研究目的.....	6
2. 材料與方法.....	9
2.1 實驗植物與栽植方式 (Plant material and growth conditions).....	9
2.2 小量質體製備 (Plasmid DNA mini preparation).....	9
2.3 中量質體製備 (Plasmid DNA midi preparation).....	10
2.4 DNA 純化 (DNA purification).....	11
2.5 質體構築 (Plasmid construction).....	11
2.6 農桿菌注射法 (Agroinfiltration).....	16
2.7 植物全 RNA 萃取 (Plant total RNA extraction).....	18
2.8 反轉錄即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-real time polymerase chain reaction).....	18
2.9 西方墨點法 (Western blotting).....	19
2.10 間接式酵素連結免疫吸附法 (indirect enzyme-linked immunosorbent	

assay).....	21
2.11 生體外轉錄與病毒 RNA 接種 (<i>in vitro</i> transcription and viral transcript inoculation)	21
2.12 以罹病組織進行病毒接種 (Virus inoculation by infected tissue)	22
2.13 GFP 螢光攝影	23
3. 結果.....	24
3.1 去除載體上之非病毒序列以增強 ORSV 與 CymMV 感染性選植株之感染力.....	24
3.2 短暫表現 ORSV 蛋白對 CymMV 累積量之影響.....	25
3.3 ORSV 與 CymMV 於 <i>N. benthamiana</i> 植株上之病毒累積情形	26
3.4 不同長度之 ORSV p126 之基因靜默抑制能力測試.....	26
3.5 ORSV 與 CymMV 複合感染之病徵觀察及系統性移動情形.....	26
3.6 構築 CymMV 螢光病毒並將其與 ORSV 共同表現.....	28
3.7 ORSV 蛋白對 CymMV-eGFP 螢光表現之影響.....	30
3.8 短暫表現不同病毒之基因靜默抑制子對 CymMV 累積量的影響.....	31
3.9 CymMV 與 TuMV、PVX 及 TMGMV 複合感染之病徵觀察及系統性移動情形.....	32
4. 討論.....	34
4.1 ORSV 與 CymMV 於接種葉之協力作用	34
4.2 複合感染時所發生之 CymMV 系統性移動	37
4.3 ORSV p126 之基因靜默抑制能力	39
4.4 CymMV 螢光病毒株之應用	40

4.5 結語.....	41
5. 參考文獻.....	42
6. 附表.....	51
7. 附圖.....	55



1. 前言



1.1 植物之防禦反應與病毒基因靜默抑制子

後轉錄基因靜默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)是植物用以攻擊 RNA 病毒的重要方式之一(Matzke et al., 2001)。該反應由雙股 RNA(double-stranded RNA)所驅動(Fire et al., 1998)，並且由具有 RNase III 活性之 Dicer-like 蛋白(DCL)對其進行截切，產生 21 至 24 個核苷酸之短片段的雙股 RNA，統稱為 small-interfering RNA (siRNA)(Bernstein et al., 2001; Vermeulen et al., 2005)。siRNA 接著與 RNA-induced silencing complex (RISC)核心區域中的 Argonaute (AGO)蛋白結合，passenger strand 受到分解而留下 guide strand，形成具有功能之 RISC，AGO 蛋白中的 PIWI 功能區具有 RNA 截切能力，可截切與 guide strand 序列互補之單股 RNA (Ding and Voinnet, 2007; Tolia and Joshua-Tor, 2007; Song et al., 2004)。RNA 病毒於複製過程中所形成之雙股 RNA 複製中間體，即為此機制下很好的攻擊目標，當病毒開始複製而形成雙股 RNA 時，即誘發植物 PTGS 反應。

病毒要能夠成功感染，就必須克服植物的防禦反應，許多研究報導，病毒透過其基因靜默抑制子(RNA silencing suppressor, RSS)來抑制植物的防禦反應(Ding and Voinnet, 2007)。不同的 RSS 可藉由攻擊 PTGS 路徑中的不同步驟來達到抑制基因靜默(RNA silencing suppression)的效果，例如 *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) p19 蛋白結合 21 個核苷酸的雙股 siRNA，形成 p19-siRNA 複合體，使其無法進入 RISC 發揮功能，進而抑制植物之 PTGS (Lakatos et al., 2004)；*Cucumber mosaic virus* (CMV) 2b 蛋白與阿拉伯芥 ARGONAUTE 1 (AGO1)交互作用，影響 miRNA 及相關 RNA silencing 抗病毒反應之路徑 (Zhang et al., 2006)；*Tobacco etch virus* (TEV) P1/HCPPro 蛋白抑制 vasiRNA 之 3'端甲基化，

使其更容易被尿嘧啶化(uridylation)而降解(Ebhardt et al., 2005)；PVX 之 p25 蛋白與阿拉伯芥 AGO1 交互作用，使其受到 proteasome 之降解而降低植物防禦反應，此外，也被證實可抑制植物系統性 RNA silencing 訊號的傳遞(Chiu et al., 2010; Voinnet et al., 2000)。



1.2 植物病毒之交互作用

植物病毒在自然界中常同時存在於相同的寄主植物，當兩種以上病毒感染同一寄主時，病毒之間就有可能產生交互作用。

交互作用類型可分為協力作用(synergy)、拮抗作用(antagonism)和中性作用(neutralism)(Mascia and Gallitelli, 2016)。一般的情況下，親緣關係愈遠的病毒，發生協力作用的可能性愈高；反之，親緣關係愈近的病毒，發生拮抗作用的情況較多(Syller and Grupa, 2016)。病毒之間不互相影響稱為**中性作用**(Untiveros et al., 2007)；**拮抗作用**意指交互作用之結果，至少其中一種病毒的感染情況相較於單獨感染為弱。交叉保護(cross-protection)是拮抗作用的應用，利用寄主受到初始感染病毒(primary/protecting virus)感染後，會對基因體類似的二次感染病毒(secondary/challenge virus)產生排斥作用，使寄主不易受到二次感染病毒之侵害。應用上將弱系病毒(mild strain virus)作為初始感染病毒，可作為植物寄主抵抗強系病毒(severe strain virus)侵染的防治手段。著名的例子為巴西與澳洲等地應用此法控制柑橘萎縮病毒(*Citrus tristeza virus*)於柑橘作物上的危害(Dawson et al., 2015)。**協力作用**則對其中一方或兩者以上都有利，該交互作用下可能引發下列效應：任一或兩者以上病毒累積量之提高、提高病毒於寄主內的移動速度、病徵加劇、提高媒介生物之傳播率，甚至是造成寄主範圍的改變(Mascia and Gallitelli, 2016)。根據報導，至少有 69 種病毒(分屬於 35 個屬中)已被歸類為彼此的協力夥伴(synergistic partner)(Latham and Wilson, 2008)。



1.3 植物病毒之協力作用

植物病毒的協力作用，最早紀錄者為 *Potato virus X* (PVX; *Potexvirus* 屬；*Alphaflexiviridae* 科)與 *Potato virus Y* (PVY; *Potyvirus* 屬；*Potyviridae* 科)於紅花菸草 (*Nicotiana tabacum*)中之研究：兩病毒複合感染時，除了病徵加劇外，PVX 之病毒 RNA 累積量及鞘蛋白(capsid protein, CP)合成速度會顯著地高於 PVX 單獨感染時的情況(Vance, 1991; Rochow and Ross, 1955)。然而，PVX/potyvirus 協力作用中病徵的嚴重與否並非只與病毒累積量有關，研究指出當 PVX 與 PVY、TEV 或 *Plum pox virus* (PPV)共同感染圓葉菸草(*N. benthamiana*)時，其病徵加劇，但 PVX 之病毒累積量並無明顯上升，除了證實病徵與病毒累積量不必然相關之外，更顯示了寄主的種類與協力作用之結果有關(Gonzalez-Jara et al., 2004, 2005)。在 *Potato leafroll virus* (*Polerovirus* 屬；*Luteoviridae* 科)與 PVY 的研究中也有類似的情況：二者複合感染所造成的病徵較單獨感染嚴重，但兩種情況下，兩病毒之累積量並無顯著差異(Srinivasan and Alvarez, 2007)。

值得注意的是，PVX 獲利的情況不必與 potyvirus 之感染有關，只需要某些 potyvirus 蛋白共同表現即可發生(Pruss et al., 1997; Vance et al., 1995)，而這些蛋白往往為病毒之 RSS。PPV 之 HCPro 透過 PVX 載體表現時，可誘發與 PPV 和 PVX 複合感染時相同的病徵，在 PPV HCPro 第 134 號胺基酸突變後(Leu→His)，蛋白即失去基因靜默抑制能力，透過 PVX 載體表現此突變蛋白時也無法產生病徵，顯示 PPV HCPro 之基因靜默抑制能力對協力作用的建立具有重要性(Gonzalez-Jara et al., 2005)。

複合感染時可能造成病毒在寄主內分布情況的改變：在 CMV 與 *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV；*Potyvirus* 屬；*Potyviridae* 科)複合感染胡瓜(cucumber)的研究中(Mochizuki et al., 2016)，原本在此寄主中為韌皮部局限性的 CMV，在與 ZYMV 複合感染

時，透過組織免疫染色 (immunohistochemistry)可觀察到 CMV 進入木質部中，且這樣的現象在 CMV-HCPro 重組病毒中(CMV 基因體中表現 ZYMV HCPro 蛋白)也可以觀察到，顯示 ZYMV HCPro 可能參與在 CMV 進入木質部的機制之中。PVY-T01 在 *N. tabacum* 中僅能感染外韌皮部細胞(external phloem cell)，然而在與 CMV-Pepo 複合感染時，則可在整個維管束組織中觀察到 PVY，且將 CMV-Pepo 之 2b (CMV 之 RSS)進行刪除突變後再與 PVY-T01 複合感染，PVY-T01 之分布便與單獨感染時無異(Ryang et al., 2004)。

複合感染時，寄主可能會失去原本對某一種病毒的抗性：攜帶 Sw5 抗性基因之番茄品系對 *Tomato spotted wilt virus* (TWSV)具有抗性，然而，預先感染 *Tomato chlorosis virus* (ToCV)的 Sw5 番茄在接種 TWSV 後，會失去其對於 TWSV 之抗性而顯現病徵(Garcia-Cano et al., 2006)。

除此之外，許多報導利用轉基因植物表現病毒的 RSS，進一步驗證該蛋白在協力作用中的貢獻。P1/HCPro 為 potyvirus 之 RSS，將 TEV 的 5'端包含 P1/HCPro 的序列轉殖到 *N. tabacum* 之中，以 PVX 接種轉基因植物，可產生與 TEV 複合感染時相同的病徵(Pruss et al., 1997)。利用 CMV-Kin 2b 轉基因 *N. tabacum* 作為寄主，接種 *Tobacco mosaic virus* (TMV)時，可造成與 CMV-Kin 複合感染 TMV 時相同的病徵，顯示 2b 蛋白在此協力現象中扮演重要角色(Siddiqui et al., 2011)。在 *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV, Potyvirus 屬)與 *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV, Crinivirus 屬)共同感染甘藷 (*Ipomoea batatas* L.)的報導中(Karyeija et al., 2000)，兩病毒單獨感染時不會產生病徵或僅輕微病徵；SPFMV 感染抗 SPFMV 甘藷品系時，即便可系統性感染，病毒量仍受到抑制；SPCSV 則為韌皮部侷限性病毒。當二者同時感染抗 SPFMV 甘藷品系時，會造成葉片嚴重脈綠化及植株嚴重矮化的現象，且在多數協力作用中扮演幫助者角色的 potyvirus (Syller, 2012)，於此報導中則受到幫助，SPFMV 的病毒 RNA 大幅度上升。值得注意的

是，在複合感染中 SPCSV 仍舊不會移動到韌皮部以外的植物組織，因此作者推測 SPCSV 可能透過某種方式抑制了寄主對於 SPFMV 之抗性，或是，透過分泌某些蛋白到韌皮部之外，使 SPFMV 具有更好的適性(fitness)(Karyeija et al., 2000)。在後續報導中將 SPCSV 的 RNase3 轉殖到抗 SPFMV 之甘藷品系，結果顯示 RNase3 具有 RSS 功能，且在此轉基因植物上接種 SPFMV 就可以誘發與複合感染 SPCSV 時相同的病徵，顯示 RNase3 在協力作用中扮演關鍵角色(Cuellar et al., 2009)。

1.4 齒舌蘭輪斑病毒與蕙蘭嵌紋病毒

蘭花為臺灣之重要經濟作物，因為相關生產管理技術成熟，加上擁有植株可附帶栽培介質輸往美國之優勢，蘭花一直為臺灣花卉外銷之大宗，佔花卉出口總額百分之九十以上。業界目前生產方式以「分生苗系統」行無性繁殖為主，具有保留親代優良性狀之優點。而「實生苗系統」之有性繁殖方式則多用來培育新種。無性繁殖系統生產過程，最需注意的是親本的健康，在這樣的生產體系下，一但親本受病毒感染，其子代均可能帶毒，造成產業的嚴重損失。許多受病毒感染的植株於小苗時並不產生病徵，直至最具有經濟效益之開花期時才得以察覺，卻已造成開花品質的下降，嚴重影響市場價值，因此病毒病害之防治一直是蘭花栽培業者首要面對的挑戰。目前許多檢測方法已被開發出來，主要利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction)及抗體偵測的方式對蘭花樣品進行病毒檢測，確保使用無毒親本進行生產(Ali et al., 2014; Lee and Chang, 2006, 2008)。

根據報導，至少有 25 種以上的病毒可感染各式不同的蘭花品種，其中以齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)及蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)最常見且造成之危害最大，兩者之複合感染情況也相當普遍，可能是肇因於二者

病毒顆粒之穩定性，且均非常容易透過切花器具於植株間傳播之因素(Zettler et al., 1990; Wong et al., 1994)。

ORSV 分類上為 *Tobamovirus* 屬、*Virgaviridae* 科之正意單股 RNA 病毒(single-stranded RNA virus)，病毒顆粒型態為桿狀，直徑約 18 nm，長度為 300-310 nm (King et al., 2011)。基因體長度約 6.6 kb，5'端為 Cap 構造、3'端為 tRNA-like 構造。帶有 4 個 open reading frame (ORF)。ORF1 和 ORF2 為 p126/p183 複製酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，ORF2 由 ORF1 透過 readthrough 策略產生全長 p183 蛋白；ORF3 為移動蛋白 (movement protein, MP)；ORF4 為鞘蛋白(capsid protein, CP)。ORF3、4 透過次基因體 RNA(subgenomic RNA)表現。

CymMV 分類上為 *Potexvirus* 屬、*Alphaflexiviridae* 科之正意單股 RNA 病毒，病毒顆粒型態為絲狀，直徑約 13 nm，長度為 470-580 nm (King et al., 2011)。基因體長度約 6.2 kb，5'端為 Cap 構造、3'端為 poly-A 構造。帶有 5 個 ORF。ORF1 為 RdRp；ORF2 至 ORF4 為 triple gene block (TGB)，功能分類屬於移動相關蛋白；ORF5 為 CP。其中 ORF2 至 5 透過次基因體 RNA 表現。

ORSV 在蘭花上可能產生的病徵包括輪斑(ringspot)、嵌紋(mosaic)、斑駁(mottle)、褪綠條紋(chlorotic streak)、花色條斑(color breaking)與壞疽(necrosis)等。CymMV 在蘭花上多為壞疽型病斑，如黑色壞疽斑點(spots)、壞疽條紋(line patterns)等等。當 ORSV 與 CymMV 同時感染至同一植株時，病徵往往會加劇。(張, 2006; Koh et al., 2014; Pearson and Cole, 1991)。

1.5 前人研究與研究目的

ORSV 與 CymMV 為蘭花上的重要病害，而兩病毒複合感染植株後所造成病徵之強

化，符合前述協力作用之定義。然而，關於二病毒之間產生協力作用之機制目前所知甚少，最早的報導為 1998 年 Hu 等人利用兩種病毒之病毒轉錄體對石斛蘭(*Dendrobium spp.*) 原生質體以電穿孔方式進行接種，並於不同時間點偵測兩病毒之正股與負股 RNA 之累積量；結果顯示，複合感染之下，正、負股 RNA 的累積量均高於兩病毒單獨感染，偵測到病毒的時間點亦提前(Hu et al., 1998)。

除了在核酸的累積量上觀察到複合感染高於單獨感染的情況，2005 年 Ajjikuttira 等人更針對移動層次的協力作用進行探討。利用轉基因菸草表現 ORSV MP 或 CP 以及 CymMV TGB1 或 CP，測試不同的 ORSV 及 CymMV 病毒突變株於其中的移動能力。結果顯示，ORSV MP 缺失病毒(接種葉無病毒核酸累積，無法細胞間移動)於 CymMV TGB1 轉基因植物中可回復細胞間移動能力，但仍無法系統性移動；ORSV CP 缺失病毒(接種葉有病毒累積，可細胞間移動，無法系統性移動)於 CymMV CP 轉基因植物無法回復系統性移動能力；CymMV TGB1 缺失病毒(接種葉無病毒累積，無法細胞間移動)於 ORSV MP 轉基因植物中可回復細胞間移動，但無法系統性移動；CymMV CP 缺失病毒(接種葉有病毒累積，無法細胞間移動)於 ORSV CP 轉基因植物中，不僅可細胞間移動，更可於系統葉偵測到其病毒 RNA，然而透過電子顯微鏡觀察，無法於接種葉或系統葉發現 CymMV 病毒顆粒，顯示不僅在接種葉上 CymMV CP 缺失病毒無法產生病毒顆粒，移動至系統葉之 CymMV CP 缺失病毒也沒有被 ORSV CP 所包覆；由接種過 CymMV CP 缺失病毒的 ORSV CP 轉基因植物中抽取粗萃取液，回接至健康菸草中，亦無法產生偵測到 CymMV。此研究結果顯示，ORSV 和 CymMV 的 MP 與 CP，功能上可能具有某種程度的互補作用 (Ajjikuttira et al., 2005)。

本實驗室黃裕雯學姊於 *N. benthamiana* 中發現，ORSV 與 CymMV 於 *N. benthamiana* 原生質體中，複合感染時核酸之累積上可展現協力作用，CymMV 明顯獲利，然而 ORSV

則否；利用農桿菌接種法(agroinoculation)同時表現 ORSV 與 CymMV 之 TGB1，於接種葉中偵測到較高的 ORSV 累積量；同時表現 CymMV 與 ORSV 之 p126，也可於接種葉中偵測到較高的 CymMV 累積量。在 GFP 轉基因菸草中測試 p126 與 TGB1 之基因靜默抑制能力，發現 p126 具有基因靜默抑制能力，而 TGB1 則否，初步推論 CymMV 之獲利源自於 p126 之基因靜默抑制能力，而 ORSV 則透過 TGB1 在接種葉上獲得較好的移動能力。為了解 p126 的四個功能區(domain)分別的基因靜默抑制能力，將 p126 的四個功能區分別獨立進行基因靜默抑制能力測試，發現四個功能區均無此功能，將它們與 CymMV 共同表現，也無法使 CymMV 獲利。此結果顯示，ORSV 與 CymMV 於菸草中仍可展現協力作用，且此現象可能與基因靜默抑制能力或移動能力之提升有關(Huang, 2014)。

本研究延續兩病毒於 *N. benthamiana* 中之試驗。因為 CymMV 於前人研究中(原生質體與農桿菌短暫表現)具有較明顯的獲利情形，因此將目標著重探討 CymMV 受到 ORSV 幫助的現象，茲列出以下研究目標：

1. 觀察 ORSV 對 CymMV 累積量之影響

(1) CymMV 與 ORSV 蛋白共表現，並觀察 CymMV 病毒累積

(2) CymMV 與 ORSV 複合感染，觀察二者之病毒累積

2. 觀察不同的病毒基因靜默抑制子對 CymMV 累積量之影響

3. 觀察 ORSV 與 CymMV 複合感染，及不同病毒與 CymMV 複合感染時的系統性移動情形

4. 觀察不同病毒基因靜默抑制子是否促進 CymMV 之系統性感染

期望透過本研究探討更多 CymMV 與 ORSV 或其他病毒之交互作用，除了更加瞭解病毒之間的協力作用之外，也提供未來防治蘭花病害之基礎知識。

2. 材料與方法



2.1 實驗植物與栽植方式 (Plant material and growth conditions)

主要試驗植物為圓葉菸草(*Nicotiana benthamiana*)及 GFP 轉基因圓葉菸草(*Nicotiana benthamiana* line 16c)(Ruiz et al., 1998; Voinnet and Baulcombe, 1997)，將其栽種於光照 16 小時(3,000~3,500 Lux)/黑暗 8 小時，平均溫度約 25°C 之溫室之中，植物年齡約 25 天(8 片本葉)時進行試驗。RNA 基因靜默抑制能力試驗中，植物年齡約 30~35 天，接種後將植物置放於平均溫度約 22°C 之溫室中一天[光照 16 小時(3,000~3,500 Lux)/黑暗 8 小時]，再移入上述平均溫度約 25°C 之溫室中直至欲觀察之天數。為方便液體注入植物體內，所有供試植物於農桿菌注射實驗前一天不澆水。

2.2 小量質體製備 (Plasmid DNA mini preparation)

將帶有質體之大腸桿菌(*Escherichia coli*, DH5α 或 XL1-blue)培養於 5 mL LB 培養基中，加入適量濃度之抗生素(最終濃度 50 ppm kanamycin 或 100 ppm ampicillin)，於 37°C 培養箱中以 225 rpm 震盪培養 14 至 16 小時。

參照 FavorPrep™ Plasmid Extraction Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan)之方法進行質體製備：將細菌培養液分次收集於相同 1.5 mL 微量離心管之底部，室溫下以 13,000 rpm (Sorvall™ Legend™ Micro 17 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, USA)，離心 1 分鐘，加入 200 μL FAPD1 buffer，將沉澱菌體懸浮；再加入 200 μL FAPD2 buffer 並充分混合，靜置於室溫 2~3 分鐘；再加入 300 μL FAPD3 buffer 並充分混合，室溫下以 13,000 rpm 離心 5 分鐘。將上清液移至 FAPD Column 中，室溫下 13,000 rpm 離心 1 分鐘；去除 collection tube 濾液，於 FAPD Column 中加入 400 μL W1 buffer，靜置 2 分鐘後，室溫下

13,000 rpm 離心 1 分鐘；去除 collection tube 濾液，於 FAPD Column 中加入 600 μ L Wash buffer，室溫下 13,000 rpm 離心 1 分鐘；去除 collection tube 濾液；室溫下 13,000 rpm 離心 3 分鐘除去 FAPD column 中殘餘液體。將 FAPD Column 置放到新的 1.5 mL 微量離心管中，並加入 50 μ L 60~70°C 二次水(ddH₂O)，靜置 2 分鐘，室溫下 13,000 rpm 離心 1 分鐘，收集含有 DNA 之濾液備用。

2.3 中量質體製備 (Plasmid DNA midi preparation)

將帶有質體之大腸桿菌(*Escherichia coli*, DH5 α 或 XL1-blue)培養於 50~100 mL LB 培養基中，加入適量濃度之抗生素(最終濃度 50 ppm kanamycin 或 100 ppm ampicillin)，於 37°C 培養箱中以 225 rpm 震盪培養 14 至 16 小時。

參照 Geneaid™ Midi Plasmid Kit (Geneaid, Taiwan)之方法進行質體製備，過程略有修改：以每次 40 mL，分次將細菌培養液收集於 50 mL 離心管之底部(4°C，6000 xg，15 分鐘)，加入 4 mL PM1 buffer；將沉澱菌塊懸浮後，加入 4 mL PM2 buffer 並充分混合，靜置於室溫 2~3 分鐘；再加入 4 mL PM3 buffer 並充分混合，室溫下以 8000 xg 離心 15 分鐘。將上清液移至預先以 5 mL PEQ buffer 流洗過之 Plasmid Midi Columns 中，使液體自然流出並移除；於 Plasmid Midi Columns 中加入 12 mL PW buffer，使液體自然流出並移除；將 Plasmid Midi Columns 移至乾淨 50 mL 離心管，加入 8 mL PEL buffer，收集自然流出之濾液；於 50 mL 離心管中(含約 8 mL 濾液)加入 6 mL 異丙醇(isopropanol)，充分混合後，置於-20°C 冰箱中 2 小時以上；將液體以 4°C，15,000 xg，離心 30 分鐘，移除上清液，並加入 5 mL 70%酒精，於相同溫度與轉速下，離心 10 分鐘；將 50 mL 離心管放置室溫下風乾 30 分鐘以上，其後加入 200~300 μ L ddH₂O 回溶沉澱物，保存溶液於-20°C 冰箱。

2.4 DNA 純化 (DNA purification)



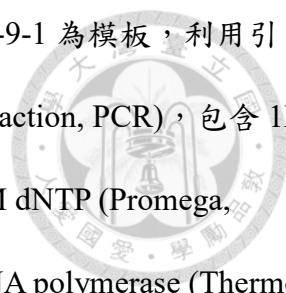
參照 QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) 進行 DNA 純化。

1. 由膠體中純化 DNA：將含有目標 DNA 片段大小之膠體切出，置入 1.5 mL 微量離心管後，加入 3 倍體積(vol/w)之 QX1 buffer 與 10 μ L QIAEX II，置於 50°C 水浴槽中加熱，每 2 分鐘懸浮 QIAEX II，共進行 10 分鐘；以 13,000 rpm 離心 30 秒，去除上清液，加入 500 μ L QX1 buffer；以 13,000 rpm 離心 30 秒，去除上清液，加入 500 μ L PE buffer，並懸浮 QIAEX II；再次重複 PE buffer 清洗步驟；以 13,000 rpm 離心 30 秒，去除上清液，風乾 5~10 分鐘，待 QIAEX II 略呈現白色狀，加入 20 μ L ddH₂O 並輕彈 QIAEX II 使之懸浮，於 50°C 水浴槽中作用 10 分鐘；以 13,000 rpm 離心 30 秒，將含有 DNA 之上清液移至新的 1.5 mL 微量離心管中。
2. 由溶液中純化 DNA：加入原溶液 3 倍體積之 QX1 buffer 與 10 μ L QIAEX II，於室溫下每 2 分鐘懸浮 QIAEX II，至少 5 分鐘；以 13,000 rpm 離心 30 秒，去除上清液，加入 500 μ L PE buffer，並懸浮 QIAEX II；再次重複 PE buffer 清洗步驟；以 13,000 rpm 離心 30 秒，去除上清液，風乾 5~10 分鐘，待 QIAEX II 略呈現白色狀，加入 20 μ L ddH₂O 並輕彈 QIAEX II 使之懸浮，於 50°C 水浴槽中作用 10 分鐘；以 13,000 rpm 離心 30 秒，將含有 DNA 之上清液移至新的 1.5 mL 微量離心管中。

2.5 質體構築 (Plasmid construction)

2.5.1 pBIN-ORSV-D22 及 pBIN-CymMV-D22

因 pBIN-ORSV-Rzh-9-1(Huang, 2014)較大，較難以反向 PCR (inverse PCR) 去除非病毒



之目標序列，故先將其構築於較小之質體之中。以 pBIN-ORSV-Rzh-9-1 為模板，利用引子對 M13F 及 ORSV-D22-R 進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，包含 1X Optimized DyNAzyme Buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)、200 μ M dNTP (Promega, USA)、5 μ M 正/反向引子對、5 ng 質體 DNA、5 U DyNAzyme II DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA)，擴增條件為 94°C/2 分鐘單循環，94°C/30 秒、55°C/30 秒、72°C/2 分鐘，30 個循環，72°C/5 分鐘單循環。將 PCR 產物於 1% TAE agarose gel 中分離，切取 1.8 kb 之目標片段，經過膠體純化後，加入 pGEM[®]-T Easy vector (Promega, USA) DNA，以 T4 DNA ligase 進行接合反應[1X T4 DNA ligase buffer, 1 mM ATP, 5% PEG-4000, 5 U T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, USA)]，構築出 pGEM-ORpBIN-5'。以 pGEM-ORpBIN-5' 為模板，利用引子對 35S-R 及 ORSV-F1 進行反向 PCR (inverse PCR)，去除 22-nt 之非病毒序列，PCR 反應包含：1X Phusion HF buffer (New England Biolabs, USA)、200 μ M dNTP (Promega)、5 μ M 正/反向引子對、5 ng 質體 DNA、2 U Phusion[®] High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, USA)；擴增條件為 98°C/30 秒單循環，98°C/10 秒、55°C/15 秒、72°C/3 分鐘，30 個循環，72°C/5 分鐘單循環。經過自接合 (self-ligation) 後構築出 pGEM-ORpBIN-5'-D22。將 pGEM-ORpBIN-5'-D22 與 pBIN-ORSV-Rzh-9-1 以 *KpnI* 與 *BstZ17I* 作用後，於 1% TAE agarose gel 中分離並分別切取 1.8 kb 與 18 kb 片段進行膠體純化，完成後進行接合反應，構築出 **pBIN-ORSV-D22**。經過 PCR 所產生之片段均經過定序確認。

pBIN-CymMV-D22 以上述相同步驟構築。構築於 pGEM[®]-T Easy vector 前，以引子對 Cy-AhdI-F 及 Cy-AhdI-R 由 pBIN-CymMV9 (Huang, 2014) 擴增出 2.7 kb 片段(extension: 72°C/3 分鐘)，最終構築出 pGEM-CypBIN-5'；並以此為模板，以引子對 35S-R 及 CymMV-FS 進行 inverse PCR (extension: 72°C/3 分鐘)，去除 22-nt 之非病毒序列，構築出

pGEM-CypBIN-5'-D22。將 pGEM-CypBIN-5'-D22 與 pBIN-CymMV9 以 *AhdI* 作用後，於 1% TAE agarose gel 中分離，並分別切取 2.7 kb 與 17 kb 片段進行膠體純化，完成後進行接合反應，構築出 **pBIN-CymMV-D22**。經過 PCR 所產生之片段均經過定序確認。

2.5.2 pCymMV-SpeI 與 pCymMV-CP-SmaI

為將 *SmaI* 切位構築至 CymMV 鞘蛋白之 ORF，以便後續插入 eGFP 序列於病毒基因體中，須將原本 pUC-CymMV9 (Huang, 2014) 用以直線化之 *SmaI* 切位去除掉。以 pUC-CymMV9 為模板，使用引子對 CymMV-CPF2 及 dT-SpeI-SbfI，擴增約 500 bp 片段，PCR 條件為：1X Q5[®] Reaction buffer、200 μ M dNTP (Promega, USA)、5 μ M 正/反向引子對、5 ng 質體 DNA、2 U Q5[®] High-Fidelity DNA polymerase；擴增條件為 98°C/30 秒單循環，98°C/10 秒、55°C/15 秒、72°C/20 秒，30 個循環，72°C/3 分鐘單循環。於 1.5% TAE agarose gel 中將 PCR 產物分離並純化目標片段後，將純化之 DNA 以 *HpaI* 與 *SbfI* 作用，完成後於溶液中純化 DNA；經 *HpaI* 與 *SbfI* 處理之 pUC-CymMV9 則於 0.8% TAE agarose gel 中分離並切取約 9 kb 之片段進行膠體純化，加入前述經過限制酶處理之 DNA，進行接合反應後構築出 **pCymMV-SpeI**。

以 pCymMV-SpeI 為模板，使用引子對 CymMV-SmaI-F 及 CymMV-SmaI-R 製造 *SmaI* 切位於 CP 之 ORF 中，以 Q5[®] High-Fidelity DNA polymerase (條件如上) 進行 inverse PCR (extension: 72°C/5 分鐘)，得到 **pCymMV-CP-SmaI**。

2.5.3 pCymMV-eGFP 及 pBIN-CymMV-eGFP

為將 eGFP 擴增並加入病毒基因體中，以 pGR-PiVX5-EGFP(He, 2012) 為模板[該質體上 eGFP 序列來自 pKGWFS7 質體(Invitrogen, USA)]，使用引子對 eGFP-F 及 eGFP-AvrII-2An-R 以 Q5[®] High-Fidelity DNA polymerase 進行 PCR (extension: 72°C/30 秒)，將 752 bp

產物於 1.5% TAE agarose gel 中分離並進行膠體純化。以 pCymMV 為模板，使用引子對 CyCP-2Ac-F 及 Cy-HpaI-R 進行 PCR 反應(extension: 72°C/15 秒)，將 238 bp 產物於 2% TAE agarose gel 中分離並進行膠體純化。將上述兩種純化產物稀釋 10 倍後，以 1:1 比率混合，使用引子對 eGFP-F 及 Cy-HpaI-R 進行重組 PCR (recombinant PCR) (extension: 72°C/30 秒)，將產物於 1% TAE agarose gel 中分離，切取 974 bp 之 DNA 片段，並進行膠體純化。純化之片段以 *SacII* 作用並進行溶液純化後，進行磷酸化反應[1X T4 DNA ligase buffer, 1 mM ATP, 5 U T4 Polynucleotide kinase (New England Biolabs, USA)]。最後，將產物與經過 *SmaI* 及 *SacII* 處理之 pCymMV-*SmaI* 進行接合反應，構築出 **pCymMV-eGFP**。

以 *BstZ17I* 及 *HpaI* 處理 pCymMV-eGFP 及 pBIN-CymMV-D22，分別於 1% TAE agarose gel 中分離 2.6 kb 及約 17 kb 產物，兩者進行接合反應後得到 **pBIN-CymMV-eGFP**。

2.5.4 pCymMV-eGFP 之鞘蛋白 N 端突變株

為避免病毒複製過程中發生重組，而去除掉外源基因的情況，嘗試將 CP ORF 之 N 端核酸序列進行突變，使其與 CPN 之序列相同度儘可能下降。以 pCymMV-eGFP 為模板，分別使用引子對 CymMV-TGB1F2 及 2A-CyCP-GP-R；CyCP-GP-F 及 Cy-HpaI-R，以 Q5[®] High-Fidelity DNA polymerase 進行 PCR (extension: 72°C/1 分鐘或 15 秒)，將產物於 1% 及 2% TAE agarose gel 中分離後，分別分離出約 2 kb 及 200 bp 片段，並進行膠體純化。將上述兩種純化產物稀釋 10 倍後，以 1:1 比率混合，使用引子對 CymMV-TGB1F2 及 Cy-HpaI-R 進行重組 PCR (extension: 72°C/1 分鐘)，將產物於 1% TAE agarose gel 中分離，切取約 2 kb 片段進行膠體純化。以 *NheI* 及 *SacII* 處理純化產物，並於溶液中純化 DNA；以 *NheI* 及 *SacII* 處理 pCymMV，將產物於 0.8% TAE agarose gel 中分離，切取約 7 kb 之片段進行膠

體純化；將兩者進行接合，得到 **pCymMV-eGFP-CP^{GP}**。以 *Bst*Z17I 及 *Hpa*I 處理 **pCymMV-eGFP-CP^{GP}** 及 **pBIN-CymMV-D22**，於 0.8% TAE agarose gel 中分別分離約 2.6 kb 及 17 kb 產物，進行接合反應，得到 **pBIN-CymMV-eGFP-CP^{GP}**。另一 CP 突變株以相同方法進行構築：分別使用 CymMV-TGB1F2 及 2ACyCP-ES-R、CyCP-ES-F 及 Cy-HpaI-R 進行 PCR 反應(條件如上述)，最終構築出 **pCymMV-eGFP-CP^{ES}** 及 **pBIN-CymMV-eGFP-CP^{ES}**。

2.5.5 將不同組合之 p126 功能區與其他 ORSV 蛋白構築於 binary vector

以 pBIN-ORSV-Rzh-9-1 為模板，利用不同引子對進行 PCR 擴增目標片段：p126-MN₁ 片段以引子對 ORSV-p126-F1 及 ORSV-p126-NonI-3'擴增；p126-N₁N₂ 片段以引子對 ORSV-p126-NonI-5'及 ORSV-p126-NonII-3'擴增；p126-N₂H 片段以引子對 ORSV-p126-NonII-5'及 ORSV-p126-R2 擴增；p126-MN₁N₂ 片段以引子對 ORSV-p126-F1 及 ORSV-p126-NonII-3'擴增；p126-N₁N₂H 片段以引子對 ORSV-p126-NonI-5'及 ORSV-p126-R2 擴增。(使用 Q5[®] High-Fidelity DNA polymerase，extension: 72°C/依據不同長度，每 1 kb 為 30 秒)。完成後，以 1% TAE agarose gel 分離並進行膠體純化、磷酸化反應後，加入預先處理過 *Sma*I 及去磷酸化反應[1X Antarctic phosphatase buffer, 5 U Antarctic phosphatase (New England Biolabs, USA)]並經過純化之 pBIN61-myc-ko (Huang, 2014)進行接合反應，得到 **pBIN-MN₁**、**pBIN-N₁N₂**、**pBIN-N₂H**、**pBIN-MN₁N₂** 及 **pBIN-N₁N₂H**，其 C 端均表現 c-myc (EQKLISEEDL)及 ko tag (WTMMDGEEQIEY)，供蛋白質偵測使用。

以 pBIN-ORSV-Rzh-9-1 為模板，將 ORSV 之移動蛋白(movement protein, MP)片段以引子對 ORSV-MPF2 及 ORSV-MPR2 擴增；ORSV 之 CP 與 CP^{E100A} 片段以引子對 ORSV-CPF1 及 ORSV-CPR-nonStop 擴增[ORSVCP^{E100A} 片段由 pORSV^{E100A}(Lin et al., 2015)中擴

增]。循上述方法得到 pBIN-ORSVMP、pBIN-ORSVCP 及 pBIN-ORSVCP^{E100A}。



2.5.6 將病毒基因靜默抑制子構築於 binary vector

本研究將 TuMV HCPro、CMV 2b 及 PVX p25 構築於 pBIN61-myc-ko；PCR 擴增目標如下：TuMV HCPro 以引子對 TuMV-HC-F1 及 TuMV-HC-R1 由 p35S-TuMV-27(Liu et al., 2016)中擴增；CMV 2b 以引子對 CMV2b-F 及 CMV2b-R 由 pBIN61-2b (Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Cambridge, U.K.)中擴增；PVX p25 以引子對 PVX-P25-F 及 PVX-P25-R3 由 pGR106(Chapman et al., 1992)中擴增。

使用不同引子對將目標片段以 PCR 擴增後，以 1% TAE agarose gel 分離，接著進行膠體純化、磷酸化反應後，與預先處理過 *Sma*I 及去磷酸化反應並經過純化之 pBIN61-myc-ko 進行接合反應，得到 pBIN-HCPro、pBIN-2b、pBIN-p25，其 C 端均表現 c-myc 及 ko tag，供蛋白質偵測使用。pBIN61-p19-myc 則由本實驗室劉漢麟學長提供(Liu et al., 2016)。

2.6 農桿菌注射法 (Agroinfiltration)

2.6.1 勝任細胞製備 (Competent cell preparation)

將農桿菌(C58C1)塗抹在帶有 10 ppm tetracycline 之 LA 培養基中，於 28°C 培養 2 天，並取單一菌落培養至 5 mL LB 培養液中，以 28°C、250 rpm 震盪培養 16 小時；將 2 mL 菌液加入 50 mL DYT 培養液中，以 250 rpm 震盪培養至 OD₆₀₀ 0.5~0.6 (4~5 小時)。以 3000 xg，4°C，離心 5 分鐘，去除上清液後，加入 10 mL 之 0.1 M MgCl₂，使菌體懸浮，於冰上靜置 1 小時。其後，以相同條件離心、去除上清液，並以 10 mL 之 20 mM CaCl₂ 再次將菌體懸浮，完成製備。製備好的勝任細胞以每管 100 μL 分裝，液態氮冷凍之，置放於-

80°C保存。



2.6.2 農桿菌轉型 (Agrobacterium transformation)

使用結凍解凍法(freeze-thaw method)(An et al., 1988)：取 100~500 ng 之質體 DNA 加入勝任細胞，冰上靜置 5 分鐘後，以液態氮冷凍 30 秒，放置於 37°C 處理 5 分鐘；加入 1 mL LB 培養液，以 28°C、250 rpm 震盪培養 1~4 小時。以 7,000 rpm 離心 2 分鐘，去除培養液後懸浮菌塊，並塗抹於帶有 10 ppm tetracycline + 50ppm kanamycin 之 LA 培養基，於 28°C 中培養 2~3 天。

2.6.3 農桿菌注射 (Agroinfiltration)

待菌落長出後，取數個單一菌落以 colony PCR 確認農桿菌帶有目標質體，挑選之並培養於 LB 培養液(50 ppm kanamycin)，28°C、250 rpm 震盪培養約 16~18 小時。在菌液中加入甘油後置放於-80°C (含 40%甘油)，完成菌種之保存。

每次實驗均重新活化農桿菌：將保存於-80°C 冰箱之菌種塗抹於 10 ppm tetracycline + 50ppm kanamycin 之 LA 培養基，待 2 天後長出菌落，刮取之並培養於 LB 培養液(50 ppm kanamycin)，16~18 小時後，按照以下步驟製備接種液。

將菌液以 5,500 rpm 離心 3 分鐘，去除上清液後以 1 mL MMA buffer (10 mM MES, 10 mM MgCl₂, 200 μM acetosyringone, pH 5.5)懸浮菌塊，以 MMA 調整至所需濃度後，避光於震盪器上搖晃(50 rpm)，進行室溫活化(induction) 2~4 小時。將懸浮液依據實驗需求混合後，以容積為 1 mL 之針筒(無針頭)吸取接種液，針筒頭緊貼葉背，將液體注射到葉片中。

濃度調整以 OD₆₀₀ (optical density)為依據，CymMV 及其相關感染性選殖株為 0.2；ORSV 為 0.3；蛋白短暫表現載體為 0.3；空載體依據各實驗而不同，將總菌量調整到

OD₆₀₀ 為 0.5。



2.7 植物全 RNA 萃取 (Plant total RNA extraction)

參照 Plant Total RNA Mini (Viogene, USA)之方法進行植物全 RNA 萃取；取 0.1~0.3 g 植物組織，以液態氮磨碎後，倒入 1.5 mL 微量離心管中，加入 450 μ L RX buffer，震盪均勻並吸取液體加入 shearing tube，室溫下以 13,000 rpm 離心 5 分鐘；吸取 collection tube 中濾液並混合 230 μ L 無水酒精，將混合均勻之液體加入 Plant Total RNA Mini Column，室溫下以 13,000 rpm 離心 1 分鐘；去除濾液，於 Plant Total RNA Mini Column 加入 500 μ L WF buffer，室溫下以 13,000 rpm 離心 1 分鐘；去除濾液，於 Plant Total RNA Mini Column 加入 700 μ L WS buffer，室溫下以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液後再重複一次本清洗步驟；去除濾液後，13,000 rpm 離心 3 分鐘去除殘餘在 Plant Total RNA Mini Column 之液體；完成後移除下層收集管，將 Plant Total RNA Mini Column 上蓋打開晾乾 10 分鐘；將 Plant Total RNA Mini Column 移至新的 1.5 mL 微量離心管，加入 50 μ L RNase-free water，靜置 5 分鐘後，室溫下以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，收集之濾液置於冰上備用，或長期保存於-80°C冰箱。

2.8 反轉錄即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-real time polymerase chain reaction)

2.8.1 DNA 去除 (DNase treatment)

純化之植物全 RNA，參照 TURBO DNA-*free*TM Kit (Ambion, USA)去除混雜之 DNA：取 6 μ g RNA，加入 5 μ L 10X TURBO DNase Buffer 與 1 μ L TURBO DNase (2 U/ μ L)，以 RNase-free water 將體積調整至 50 μ L，放置 37°C反應 1 小時；反應完成後，加

入 5 μ L DNase Inactivation Reagent，每隔 1 分鐘輕微震盪之，維持其懸浮狀態，至少 5 分鐘；以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，吸取上清液至新的 1.5 mL 微量離心管中，完成 DNA 去除。



2.8.2 反轉錄反應 (Reverse transcription)

參考 SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) 之方法進行反轉錄：取出 8.25 μ L RNA (DNase-treated) 加入 0.75 μ L 之 5 μ M 反向引子 (CymMV 之偵測以 50 μ M dT-VN) 與 0.75 μ L 10 mM dNTP，於 65°C 中反應 5 分鐘，完成後置於冰上。

加入 3 μ L 5X FS buffer、0.75 μ L 0.1 M DTT、0.75 μ L rRNasin (Promega)、0.75 μ L Superscript III reverse transcriptase (200 U/ μ L)，於 50°C 中反應 1 小時，完成後以 70°C 反應 15 分鐘去除酵素活性。加入 30 μ L RNase-free water 稀釋後(完成「cDNA 稀釋液」製備)置於 -20°C 冰箱備用。

2.8.3 即時定量 PCR 反應 (real-time PCR)

使用 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)；試劑為 Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)；引子對最終濃度為 0.25 μ M，加入 2 μ L cDNA 稀釋液，總反應體積 20 μ L。PCR 條件為：95°C/10 分鐘單循環，95°C/15 秒、60°C/1 分鐘，40 個循環。首次使用之引子對，額外進行 melt curve 分析，確認擴增產物之專一性。病毒累積量以 $\Delta\Delta C_t$ 進行相對定量，以 protein phosphate 2A (PP2A) 作為控制基因 (Liu et al., 2012)。

2.9 西方墨點法 (Western blotting)

秤取 0.1~0.3 g 植物組織以液態氮研磨，加入 2 倍體積 (vol/w) 之 GUS extraction buffer

[10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.1% SDS, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 使用前加入 1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)]，待液體解凍後，將之混合均勻並吸取液體至 1.5 mL 微量離心管中，以 12,000 rpm 於 4°C 中離心 10 分鐘。吸取 60 μ L 之上清液，加入 20 μ L 4X sample buffer (200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8% SDS, 40% glycerol, 4% β -mercaptoethanol, 50 mM EDTA, 0.04% bromophenol blue)；96°C 反應 10 分鐘，短暫離心後，取適量體積之樣本進行十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。

以 70 伏特、25 mA/gel、25 分鐘令樣本於 5% stacking gel 中泳動，緊接著以 180 伏特、25 mA/gel 使樣本於 separation gel (目標蛋白為 20~50 kDa，使用 12.5%；50 kDa 以上則使用 10%) 泳動 40~50 分鐘以分離蛋白。完成分離之 polyacrylamide gel 以 1X CAPS buffer (10 mM CAPS, 10% methanol, 0.8 mM DTT) 浸泡 10 分鐘，PVDF 膜 (Millipore, USA) 以 100% 甲醇浸泡 30 秒後，以 1X CAPS buffer 浸泡 5 分鐘。使用 Semi-Dry Electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, USA) 將以下物品由下而上堆放：濾紙片 (Ahlstrom Munktell, Sweden)、PVDF 膜 (Millipore, USA)、polyacrylamide gel、濾紙片，避免各層之間產生氣泡。以 25 伏特、35 mA/gel 轉漬 30~40 分鐘。

完成轉漬之 PVDF 膜以 5% 脫脂奶粉於 37°C 下反應 45 分鐘，完成後以 1% 脫脂奶粉稀釋一次抗體 [anti-ORSV CP: 5,000X; anti-CymMV CP: 10,000X; anti-myc: 2,000X (Biomann scientific Co., Ltd., Taiwan)]，於 4°C 下反應 16 小時，或 37°C 下反應 45 分鐘，接著以適量 1X PBS-T buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 0.05% Tween-20, pH 7.4) 清洗 10 分鐘，重複三次。完成後加入以 1% 脫脂奶粉稀釋之二次抗體 [anti-rabbit-HRP: 20,000X (GE Healthcare, UK)]，於 37°C 下反應 45 分鐘，重複上述 PBS-T buffer 清洗步驟。將多餘液體吸除後，以適量 ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP

Substrat (Millipore, USA)進行反應，使用 Super RX-N film (Fuji, Japan)偵測冷光訊號。



2.10 間接式酵素連結免疫吸附法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay)

秤取植物後，加入 10 倍體積之 coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) 研磨，將液體取出至新的 1.5 mL 微量離心管，以轉速 13,300 rpm 離心 1 分鐘，取 100 μL 上清液至 96 孔盤(每個樣本至少 3 重複)，於 37°C 下反應 1 小時；每孔洞以 200 μL 1X PBS-T buffer 清洗 6 次，甩乾後加入 100 μL 2% 脫脂奶粉(稀釋於 1X PBS buffer)，37°C 下反應 30 分鐘；進行上述清洗步驟，甩乾後加入 100 μL 一次抗體[稀釋於 ECI buffer，2% PVP-40k (polyvinyl pyrrolidone), 0.2% BSA (bovine serum albumin), 0.02% NaN₃, in PBS-T buffer，同西方墨點法中一次抗體之稀釋倍率]，37°C 下反應 1 小時；進行上述清洗步驟，甩乾後加入 100 μL 二次抗體(anti-rabbit-AP, QED bioscience Inc., USA，稀釋 10,000 倍於 ECI buffer)，37°C 下反應 1 小時；進行上述清洗步驟，甩乾後加入呈色液 [1 mg 之 p-nitrophenyl phosphate (p-NPP), disodium hexahydrate (aMERSCO) 溶解於 1 mL 之 PNP buffer (9.7% diethanolamine, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8)]，於 15、30、45 及 60 分鐘紀錄 OD₄₀₅ 讀值。

2.11 生體外轉錄與病毒 RNA 接種 (*in vitro* transcription and viral transcript inoculation)

2.11.1 Plasmid DNA 直線化 (Plasmid linearization)

將 10 μg 質體 DNA，以 0.5 μL *Spe*I (20 U/μL) 於 37°C 作用 16 小時，以 1% TAE agarose gel 進行電泳，檢驗酵素作用是否完全，確認後以 QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) 進行純化。



2.11.2 生體外轉錄 (*in vitro* transcription)

以 T7 RNA polymerase (Invitrogen, USA) 進行生體外轉錄，於室溫下製備以下反應，最終反應體積為 50 μ L。

第一步：取 1.8 μ g 直線化 DNA，包含 1X T7 buffer、1 mM [ACU]TP (Promega, USA)、0.1 mM GTP (Promega, USA)、0.25 mM cap analog (New England Biolabs, USA)、5 mM DTT、40 U rRNasin (Promega, USA), 100 U T7 RNA polymerase，以 RNase-free water 調整體積至 41 μ L。混合均勻並將液體短暫離心後，於 37°C 反應 15 分鐘。

第二步：加入 GTP 使其終濃度提升為 1 mM，最終體積為 50 μ L，於 37°C 反應 75 分鐘，完成反應。

取 0.5 μ L 反應產物與 2X RNA dye (95% formamide, 0.025% SDS, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 0.5 mM EDTA) 混合後，於 70°C 反應 10 分鐘，以 1% TAE agarose gel 檢視 RNA 品質。完成之產物保存於 -80°C 冰箱。

2.11.3 以病毒 RNA 轉錄體接種 (*viral transcript inoculation*)

將生體外轉錄產物加入等體積之 2X GKP buffer (100 mM glycine, 60 mM K_2HPO_4 , 2% celite, 2% bentonite, pH 9.2) 進行稀釋 (Petty et al., 1989)，穿戴橡膠手套，直接塗抹於植物表面。

2.12 以罹病組織進行病毒接種 (*Virus inoculation by infected tissue*)

秤取罹病組織 0.2 g 於液態氮中研磨，加入 5 倍體積 (vol/w) 之 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 並混合均勻後，將液體取出至 1.5 mL 微量離心管，室溫下以 13,300 rpm 離心 1 分鐘，取出上清液，依據不同處理進行混合。單獨感染之接種源，以罹

病植物汁液與健康植物汁液等體積混合；複合感染之接種源，以相對應之罹病植物汁液等體積混合。穿戴橡膠手套，每片葉片以 20 μ L 輔以少量 celite 輕抹於葉片表面。

罹病組織來源如下：ORSV 及 CymMV 以農桿菌接種法注射於圓葉菸草葉背，5 天後摘取接種葉，ORSV 來自 pBIN-ORSV-D22 (本篇研究)；CymMV 來自 pBIN-CymMV-D22 (本篇研究)；ORSV^{E100A} 與 TMGMV (Yao, 2011) 以病毒 RNA 轉錄體接種於 3~4 周大之圓葉菸草，分別於 7 天後摘取接種葉(ORSV^{E100A})或於 5 天後摘取系統葉(TMGMV)；TuMV 及 PVX 分別以 p35S-TuMV-27 質體及 pGR106 質體，一棵植物接種 3 片，每片 10 μ g 質體 DNA，輔以少量 celite 輕抹於葉片表面，於接種後 7 天摘取病徵明顯之系統葉。摘取之葉片秤取 0.2 g 後置於-80 冰箱備用。

2.13 GFP 螢光攝影

使用手持式 UV 燈 (Blak-Ray™ Model B-100AP/R lamp, UVP, Upland, CA, USA)，波長 365 nm，以數位相機 Nikon D50 搭配 Y2 (Tamron, Saitama, Japan) 與 PO0 (Kenko, Tokyo, Japan) 濾鏡拍照。曝光時間 5~10 秒，光圈 f/8~f/13。

3. 結果



3.1 去除載體上之非病毒序列以增強 ORSV 與 CymMV 感染性選殖株之感染力

本實驗室李淑娟學姊首先構築以 T7 啟動子驅動之 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)pORSV-7 感染性選殖株(Lee, 2008)。經過張羽萱學姊將此 ORSV 感染性選殖株改為 35S 啟動子驅動，並在病毒 3'端非轉譯區(3'-UTR)後方增加核糖酶(ribozyme)建構出 p35S-ORSV-Rzh-9-1，改善了此病毒在利用 p35S 質體 DNA 接種之效率(Chang, 2015)。為利於農桿菌接種法實驗之進行，黃裕雯學姊將 p35S-ORSV-Rzh-9-1 構築於 binary vector pBIN61 之中，得到 pBIN-ORSV-Rzh-9-1(Huang, 2014)；此外，她利用從嘉德麗雅蘭中分離到的蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)，構築出 T7 promoter 驅動之 pUC119-CymMV，以及得以使用農桿菌表現之 pBIN-CymMV9 (Huang, 2014)。然而在 pBIN-ORSV-Rzh-9-1 與 pBIN-CymMV9 之 5'-UTR 上游均有 22 個非病毒核苷酸，此為構築過程中未特別刪除之載體序列，已有文獻指出在 UTR 中加入非病毒序列會導致病毒感染力之下降(Turpen et al., 1993)，故本研究嘗試將非病毒序列移除，並將其感染力與原本的感染性選殖株進行比較。使用間接式酵素連結免疫吸附法(indirect enzyme-linked immunosorbent assay, I-ELISA)偵測病毒鞘蛋白含量，結果顯示，pBIN-ORSV-D22 於接種後 6 天及 pBIN-CymMV-D22 於接種後 4 天之病毒鞘蛋白累積量均顯著高於 pBIN-ORSV-Rzh-9-1 及 pBIN-CymMV9 (圖一)，顯示去除非病毒序列後的感染性選殖株之感染力均有顯著提升。

3.2 短暫表現 ORSV 蛋白對 CymMV 累積量之影響



在多次前測試中，發現以 pBIN-CymMV-D22 作為接種源，使用農桿菌接種法共表現 *Tomato bushy stunt virus* p19 蛋白時，其受到幫助的情況不甚明顯(於討論中描述)。為使各外源蛋白所造成的效應更加明顯，使用 pBIN-CymMV9 作為接種源(Huang, 2014)，進行農桿菌接種法共表現病毒與蛋白之實驗。

目前已證實 ORSV p126 蛋白具有協助 CymMV 累積量於 *N. benthamiana* 植物中提升之功能(Huang, 2014)，除了此蛋白以外，同時想瞭解 ORSV 之移動蛋白(MP)與鞘蛋白(CP)是否可增加 CymMV 之累積量；我們利用農桿菌接種法同時表現 CymMV 與上述 ORSV 蛋白，並於接種葉中偵測 CymMV 病毒累積量。結果顯示，以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應(reverse transcription real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)偵測 CymMV 病毒 RNA，所有處理中僅有共表現 p126 的組別具有顯著差異，共表現 MP 及 CP 的組別則否(圖二 A)；然而，雖然共表現 CP 之組別於 RT-qPCR 檢測中，與對照組(EV)無統計之顯著差異，但在三次的獨立試驗中，其病毒累積量均高於對照組(未出示資料)；此外，於西方墨點法(Western blot)檢測中，除 ORSV p126 之外，共表現 ORSV CP 亦可造成 CymMV CP 累積量之提升(圖二 B)。目前已證實 CP 單一胺基酸之突變會使 ORSV 失去於 *N. benthamiana* 中系統性移動之能力(Lin et al., 2015)，欲了解造成此系統性移動能力喪失之突變位點，是否會影響該蛋白與 CymMV 之交互作用。以相同方式進行分析的結果，發現 CP^{E100A} 與 CP 呈現類似之情形：CymMV 病毒 RNA 累積量無顯著差異，但仍可使 CymMV CP 略為提升(圖二)。

3.3 ORSV 與 CymMV 於 *N. benthamiana* 植株上之病毒累積情形

ORSV 與 CymMV 於 *N. benthamiana* 原生質體中可展現協力作用，使 CymMV 累積量提升(Huang, 2014)。欲了解在植物體上兩病毒間是否仍具有協力作用，以農桿菌接種法複合接種兩病毒於 *N. benthamiana* 中，並偵測病毒累積量。RT-qPCR 結果顯示，除了在接種後第二天，複合感染下 CymMV 的累積量顯著低於單獨感染，其餘時間點兩病毒之累積量均無顯著差異(圖三 A)。以 Western blot 分析兩病毒之鞘蛋白含量，發現複合感染下 CymMV CP 累積量低於單獨感染，ORSV CP 累積量則無明顯差異(圖三 B)。本實驗結果顯示，ORSV 與 CymMV 複合感染 *N. benthamiana* 植株時，其結果異於共同接種至原生質體中之結果。換言之，從 ORSV 與 CymMV 於接種葉上的累積量無法觀察到兩者間有協力作用產生。

3.4 不同長度之 ORSV p126 之基因靜默抑制能力測試

前人研究結果顯示，ORSV p126 為一基因靜默抑制子，然而將其四個功能區分別獨立表現時，於轉 GFP 圓葉菸草(*N. benthamiana* line 16c)中之基因靜默抑制能力消失(Huang, 2014)。本研究欲了解，是否該能力之展現需要有不同功能區之間互相幫助，因此透過將鄰近之二至三個功能區相互連結的方式，構築出 5 種不同組合的 p126 蛋白(圖四)，進行 *N. benthamiana* line 16c 中的基因靜默抑制能力測試。結果顯示，除了全長之 p126 有抑制基因靜默之能力，其餘不同組合的 p126 蛋白之螢光展現均與對照組無異，顯示這些蛋白均無抑制基因靜默之能力(圖五)。

3.5 ORSV 與 CymMV 複合感染之病徵觀察及系統性移動情形

ORSV 與 CymMV 複合感染蘭花時，病徵有更加嚴重的趨勢(Pearson and Cole, 1991;

張, 2006; Koh et al., 2014), 欲了解在 *N. benthamiana* 中是否仍可觀察到病徵強化的現象, 本實驗利用罹病組織汁液接種, 進行單獨與複合接種並觀察其接種葉與系統葉之病徵。此外, 利用 ORSV^{E100A} 喪失其於 *N. benthamiana* 植株中系統性移動能力的特性, 觀察 CymMV 複合感染時此突變株時, 與野生型 ORSV 相比是否會有不同的結果。病徵觀察上, ORSV 感染 *N. benthamiana* 後約在接種後 6~7 天可見系統葉出現嵌紋及捲葉病徵, 而 ORSV^{E100A} 與 CymMV 皆無法在 *N. benthamiana* 中系統性移動, 故與預期相同, 二者之非接種葉仍與對照組(健康汁液接種之植物)相同, 皆未出現病徵(圖六)。ORSV 與 CymMV 複合感染的植株上, 除了最頂端之新生系統葉仍顯現如 ORSV 單獨感染之病徵外; 接種後第 10 天於植物中段的系統葉(約第 9~11 片本葉)可見斑駁與褪綠塊斑出現, 此病徵在 ORSV 單獨感染時不會產生; 接種後 15 天有更多葉片(約第 8~12 片本葉)會產生斑駁與褪綠塊斑(圖六 A)。ORSV^{E100A} 與 CymMV 複合感染之下, 無任何系統病徵顯現(圖六、A)。

單獨接種 ORSV 與 ORSV^{E100A} 之接種葉並無明顯病徵, 而 CymMV 則可產生白點(圖五 B)。值得注意的是, 在 ORSV 與 CymMV 複合感染之下, 原本的小白點會隨時間擴大, 且慢慢癒合, 使葉片呈現許多褪綠灰白塊斑。而 ORSV^{E100A} 與 CymMV 複合感染則只呈現與 CymMV 單獨感染時相同的微小白點(圖六 B)。

為了解複合感染時, 兩病毒之移動狀況, 利用 I-ELISA 對接種後 8、15 天之複合感染 ORSV 與 CymMV 之植株進行偵測, 取樣點以 ORSV+CymMV 系統葉病徵之褪綠塊斑處為目標, 其他組別取相對應位置的葉片。結果顯示, 複合感染 ORSV 與 CymMV 組別內所檢測的 5 棵植株的系統葉中, 均有 ORSV 與 CymMV 之感染(表二), 顯示當 ORSV 與 CymMV 複合感染時, ORSV 移動至系統葉的能力不變, 而 CymMV 則獲得系統性移動的能力。此外, 在所檢測的 3 棵 ORSV^{E100A} 與 CymMV 複合感染植株中, 於系統葉上並未偵測任何 ORSV 與 CymMV 訊號, 顯示兩者之間於移動層次上均未對彼此產生協力作用(表

二)。



3.6 構築 CymMV 螢光病毒並將其與 ORSV 共同表現

為了解 CymMV 於菸草中系統性移動之情形，本實驗參考 Minato 等人(2014)的方法，構築出三種可表現 eGFP 之 CymMV 感染性選殖株(Minato et al., 2014)(圖七與圖八)。

根據 Minato 等人(2014)研究，利用重複之鞘蛋白次基因體啟動子(duplicated coat protein subgenomic promoter)表現 sGFP，病毒在植物體內移動過程中會發生重組並刪去外源螢光序列，且必須要有原始的 CP 啟動子序列方可有效表現外源序列。該篇研究首先將 PIAMV CP 之 5'端 30 個核苷酸(簡稱 CPN)融合至 sGFP 之 5'端，保留了原始的啟動子序列(位於 CPN)，構築出 pLi-CPNsGFP Δ CP；雖然可穩定表現螢光，但因該選殖株缺少 CP 而無法系統性移動，不符合本研究之需求，故轉而參考其 2A peptide 表現外源蛋白之策略。該研究之感染性選殖株 pLi-CPNsGFP-fCP 帶有 CPN 序列於 sGFP 之 N 端，2A 序列在其 C 端，其後緊鄰完整的 CP ORF 序列；結果發現此選殖株仍會有重組發生。在無法刪去 PIAMV CP N 端序列的情況下(因為 pLi-CPNsGFP- Δ NCP 無法細胞間移動)，轉而將 CP ORF 中 N 端序列進行修改，獲得良好的成效。本研究首先參考 pLi-CPNsGFP-fCP 之作法構築出 pCymMV-eGFP，亦參考 pLi-CPNsGFP-mtfCP 構築方式，構築出兩種 CP ORF 之 N 端突變的感染性選殖株：pCymMV-eGFP-CP^{GP} 及 pCymMV-eGFP-CP^{ES}(圖八)。pCymMV-eGFP-CP^{GP} 中僅核苷酸改變，胺基酸序列與野生型無異，pCymMV-eGFP-CP^{ES} 則是參考 NCBI 資料庫(accession number: AM236023.1)，嘗試在核苷酸序列變化最大的情況下保有 CP 之特性，故將第二個(Gly)及第八個胺基酸(Pro)位點更改為 glutamic acid 及 serine，取此二胺基酸之簡寫「ES」作為命名依據，胺基酸未突變之 pCymMV-eGFP-CP^{GP} 則以野生型的胺基酸序列「GP」作命名。

首先構築出 pCymMV-eGFP 並嘗試以病毒轉錄體(viral transcript)進行接種，前測結果發現，以 CymMV-eGFP 轉錄體接種後 5 天在 *N. benthamiana* 可觀察到明顯綠色螢光，但其所產生的感染位點(infection foci)很少，1 μ g 病毒轉錄體於每片接種葉上約產生 1~2 個感染位點，將感染後 7 天之病斑採收後再次機械接種於健康菸草上，病斑數量雖大幅增加，但數量仍然有限(未出示資料)。為解決表現量不高的問題，嘗試將帶有螢光基因之病毒序列次選殖至 binary vector 上(以 pBIN-CymMV-D22 為骨架)，構築出 pBIN-CymMV-eGFP(圖七)，改以農桿菌接種法進行實驗。

將 pBIN-CymMV-eGFP 質體轉型至 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 中，以農桿菌接種法表現螢光病毒，於接種後 3~4 天可見注射區域發出綠色螢光(圖九(A) EV)。為了解 ORSV 是否能幫助此螢光病毒移動至系統葉，將 CymMV-eGFP 與 ORSV 以農桿菌接種法共同表現，於接種後 4 天觀察接種葉。相較於對照組(CymMV-eGFP+EV)，共表現 ORSV 之區域並不會使螢光量有太大的改變，但會產生螢光聚集的小亮點(圖九 A)；接種後 6 天，對照組的螢光逐漸消散，但表現 ORSV 的區域則仍維持綠色螢光，且可在葉脈處觀察到綠色螢光，此現象至少維持到接種後 10 天(圖九 A)。由全葉注射的結果更明顯觀察到有 ORSV 複合感染的情況下，CymMV-eGFP 螢光訊號在接種後第 6 天及第 10 天出現在葉脈處(圖九 B、C)。然而後續觀察中，螢光訊號並沒有繼續往葉柄與莖部移動的現象，於接種後 14 天也無法在系統葉觀察到螢光訊號(未出示資料)。以上結果顯示，在有 ORSV 共同感染的情況下，CymMV-eGFP 可移動到葉脈，但無法移動到系統葉。

為解決 CymMV-eGFP 之螢光無法於系統葉中觀察到之情形，構築出核苷酸序列經過修改之 CymMV-eGFP-CP^{GP} 及 CymMV-eGFP-CP^{ES} 以減少重組的機會，可望提升螢光表現之穩定性；欲了解二者是否在複合接種 ORSV 的情況下可表現螢光於系統葉，因此利用農桿菌接種法將其與 ORSV 共表現於 *N. benthamiana*。在接種後第 7 天觀察發現，CymMV-

eGFP 與 CymMV-eGFP-CP^{GP} 在 ORSV 的協助下均已進入葉脈，而 CymMV-eGFP-CP^{ES} 則無此現象(圖十)。特別值得注意的是，CymMV-eGFP 與 CymMV-eGFP-CP^{GP} 在與 EV 共表現的組別中，仍可觀察到部分螢光出現在葉脈(圖十)，顯示 CymMV 本身即使不透過 ORSV 的幫助仍可進入葉脈，但在有 ORSV 共同感染的狀況下，螢光表現量會較高，也顯示本實驗室之 CymMV 分離株可以進入 *N. benthamiana* 之葉脈，但無法透過維管束組織感染到系統葉。

本實驗結果發現，三種 CymMV 螢光表現株於接種葉之螢光表現情況並無差異。透過與 ORSV 之共同感染，除了螢光表現量會增加外，也可促進 CymMV-eGFP 與 CymMV-eGFP-CP^{GP} 移動至葉脈之中；但在 EV 與 ORSV 共表現的情況下，CymMV-eGFP-CP^{ES} 皆無法進入到葉脈之中(圖十)。

3.7 ORSV 蛋白對 CymMV-eGFP 螢光表現之影響

螢光病毒除了可用來追蹤病毒之移動，也可用以直接觀察病毒之感染性強弱(Brosseau and Moffett, 2015)。本研究利用農桿菌接種法將 CymMV-eGFP 與 ORSV p126、MP 與 CP 進行共表現，觀察螢光表現之情形，除驗證 RT-qPCR 與 Western blot 之結果外，也可用以推論 ORSV 蛋白對 CymMV 累積量與移動之影響。

實驗設計上，除了單獨表現三種蛋白以外，也將三種蛋白一起表現，觀察蛋白之共同表現能否觀察到如共表現 ORSV 時的螢光累積情形。接種後 4 天，相較於對照組，共表現 p126 的組別明顯累積較多螢光量，MP 則較低，CP 無明顯差異；接種後 6 天，共表現 p126 之螢光量仍高於對照組，MP 則幾乎沒有螢光顯現，CP 則高於對照組(圖十一 A)。而共表現三種蛋白(p126+MP+CP)於接種後 4 天無明顯差異，在接種後 6 天高於對照組。為更方便觀察共表現各蛋白時，能否促進 CymMV-eGFP 移動至葉脈，也進行了全葉注射之

試驗(圖十一 B)。結果發現，除了共表現 ORSV 能夠使螢光出現於葉脈，其他組別均無法於葉脈中觀察到螢光訊號。

以上結果顯示，共表現 ORSV 之 p126 與 CP 可使 CymMV-eGFP 螢光表現提升，而 MP 則無此效果。此外，欲增進 CymMV-eGFP 移動至葉脈，單獨表現 p126、MP 或 CP，甚至是三者共表現，均無法成功，必須要配合 ORSV 病毒的感染。

3.8 短暫表現不同病毒之基因靜默抑制子對 CymMV 累積量的影響

前人研究推測，ORSV p126 可能透過基因靜默抑制能力，建立與 CymMV 之間的協助作用(Huang, 2014)。欲了解此現象是否具有專一性，選用許多已知為病毒基因靜默抑制子(RNA silencing suppressor, RSS)的蛋白進行共表現，並觀察 CymMV 病毒累積情形。本研究選用 *Turnip mosaic virus* HCPro、*Cucumber mosaic virus* 2b、*Potato virus X* p25 及 *Tomato bushy stunt virus* p19 進行測試，以 pBIN-CymMV9 作為接種源。

結果顯示，當以 RT-qPCR 偵測共表現不同 RSS 組別之 CymMV 病毒累積量時，TuMV HCPro、CMV 2b 和 TBSV p19 帶給 CymMV 之效益最大，其次為 ORSV p126，而 PVX p25 影響最少；然而在三次獨立試驗中，PVX p25 均有提升 CymMV 病毒累積量之效果(未出示資料)(圖十二 A)。以 Western blot 偵測病毒 CP 累積量，也可觀察到與 RT-qPCR 相符的趨勢(圖十二 B)。

利用 CymMV-eGFP 與不同病毒基因靜默抑制子共表現來觀察螢光累積情形，以驗證 RT-qPCR 與 Western blot 之結果。結果顯示，接種後 4 天，除了共表現 PVX p25 與對照組無明顯差異，其餘組別之螢光表現均明顯高於對照組(圖十三)；接種後 6 天，對照組、ORSV p126 與 CMV 2b 組別之螢光表現略為下降，但後兩者仍與對照組有差異，TBSV p19 與 TuMV HCPro 螢光表現量仍高，PVX p25 則在此時間點與對照組產生差異。

綜合以上結果，PVX p25 雖於 RT-qPCR 與 Western blot 試驗中無顯著提升 CymMV 病毒累積之功能，然而於螢光觀察試驗中，仍可減緩螢光消退之速度。因此，儘管在協助的程度上有所差異，本研究發現不僅只有 ORSV p126，其他具有基因靜默抑制能力之 RSS 也都有助於提升 CymMV 於 *N. benthamiana* 上的累積量。

許多研究發現，透過異源 RSS 之表現，可使病毒移動至原本無法感染的區域 (Mochizuki et al., 2016; Wege and Siegmund, 2007)。本研究透過將 CymMV-eGFP 與上述 RSS 共表現後，觀察 eGFP 訊號是否有出現在葉脈或其他維管束組織中。結果顯示，短暫表現上述任一 RSS 均無法使 CymMV-eGFP 移動至維管束組織中，顯示不論 RSS 能夠為 CymMV 累積量帶來多大的效益，均無法協助(或無法單獨協助)CymMV 系統性感染。

3.9 CymMV 與 TuMV、PVX 及 TMGMV 複合感染之病徵觀察及系統性移動情形

為了解其他病毒是否也可以影響 CymMV 之系統性移動情形，本研究測試與 ORSV 同為 *Tobamovirus* 屬之 *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV)；以及另外兩種不同屬之病毒，分別為 *Potyvirus* 屬之 *Turnip mosaic virus* (TuMV)；*Potexvirus* 屬之 *Potato virus X* (PVX)。TMGMV 與 ORSV 同屬，可初步了解此屬之病毒是否均可對 CymMV 產生協力作用，而使其成功系統性感染。此外，*Potyvirus* 屬與 *Potexvirus* 屬是植物病毒協力作用中常見的模式病毒屬；而 PVX 則與 CymMV 同屬。本試驗可了解 CymMV 與不同屬或同屬病毒之間，在感染過程中是否有協力作用之產生。

首先在系統葉之病徵方面，TuMV 單獨感染或 TuMV 與 CymMV 複合感染 *N. benthamiana* 時，病徵大致上無明顯差異；兩種處理在接種後 4~5 天，在 *N. benthamiana* 系統葉上可觀察到嚴重捲葉之病徵，且葉片明顯褪綠黃化；約在接種後 10 天頂端停止生

長，惟接種後 15 天可在部分複合感染植株中發現壞疽斑點(圖十四 A)。PVX 單獨感染或 PVX 與 CymMV 複合感染中，同樣於接種後 4~5 天，在系統葉有明顯的褪綠斑點、嵌紋或斑駁之病徵，直到接種後 15 天植物仍維持生長，惟新生葉片均產生上述病徵，此二處理組之系統葉病徵無明顯差異(圖十四 A)。TMGMV 或 TMGMV 與 CymMV 複合感染中，兩處理組在接種後 5~6 天，可在系統葉觀察到捲葉病徵，一直到接種後 15 天，植物仍維持生長，但高度較矮，且側芽明顯增生；與 TuMV 之捲葉病徵不同，TMGMV 的捲葉病徵較輕微，且褪綠現象較不明顯；而此二處理組之系統葉病徵在有無 CymMV 複合感染之下並無太大差異(圖十四 A)。

在接種葉之病徵方面，TuMV 與 CymMV 複合感染處理於接種後 10 天可觀察到見灰白色壞疽斑點，病斑擴大、癒合，最終使葉片焦枯；在 TuMV 單獨感染時則無此現象(圖十四 B)。PVX 與 CymMV 複合感染時，接種葉並不出現特別的病徵(未出示資料)。而 TMGMV 與 CymMV 複合感染時，接種葉的病徵與 ORSV 複合感染 CymMV 時類似，由 CymMV 所引起之白色小斑點會擴大為褪綠灰色塊斑(圖十四 C)。

為了解 TuMV、PVX 及 TMGMV 與 CymMV 複合接種後，CymMV 是否能移動至系統葉，利用 I-ELISA 對系統葉進行檢測，發現於檢測的 30 棵 TuMV+CymMV 複合感染植物中，有 17 棵有檢測到 CymMV(比率 56.6%)；於檢測的 8 棵 PVX+CymMV 複合感染植物中，有 4 棵有 CymMV 訊號(50%)；於檢測的 3 棵 TMGMV+CymMV 複合感染植物中，3 棵全部都有 CymMV 訊號(100%)(表二)。顯示此三種病毒均可協助 CymMV 移動至系統葉，但所引發協力作用的程度不同。

4. 討論



4.1 ORSV 與 CymMV 於接種葉之協力作用

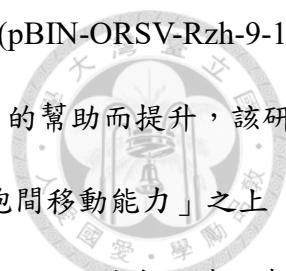
根據前人研究，共表現 CymMV 與 ORSV p126 可使 CymMV 之累積量提升，並且推論該協力作用源自於 p126 之基因靜默抑制能力(Huang, 2014)。本研究以 CymMV 與 p126 共表現的試驗結果作為正對照組，另也額外發現到 ORSV CP 或 ORSV CP^{E100} 同樣具有提升 CymMV 累積量之功能(圖二 B)。其他屬的病毒 CP 可作為 RSS 的例子有：CTV (*Closterovirus* 屬) (Lu et al., 2004)；*Tomato chlorosis virus* (*Crinivirus* 屬)，以及 *Tomato ringspot virus* (*Nepovirus* 屬)(Karran and Sanfacon, 2014)。目前尚無報導 tobamovirus 之 CP 具有 RSS 功能，而 ORSV 之 CP 及 CP^{E100A} 是否具有此功能仍需進一步驗證，因此，CP 和 CP^{E100A} 是透過何種機制對 CymMV 產生協力作用，目前尚不清楚。CymMV 與 ORSV MP 共表現時，不論在病毒 RNA 或病毒 CP 的累積(圖二)，以及 CymMV-eGFP 螢光表現上(圖十一)，均無協力作用產生，甚至有使病毒累積量下降的情況。在 Hisa 等人(2014)的研究中發現，*Clover yellow vein virus* (*Potyvirus* 屬)之 P3N-PIPO 移動蛋白儘管在與 *White clover mosaic virus* (WCIMV; *Potexvirus* 屬)之協力作用中，扮演促進 WCIMV 移動的角色，但卻可能會誘發植物防禦反應，進而抑制在接種葉之病毒累積量(Hisa et al., 2014)。Tobamovirus 之 MP 會結合在原生質絲，參與在病毒之細胞間移動(Heinlein et al., 1995; Epel et al., 1996; Padgett et al., 1996)，我們推測 CymMV 與 ORSV MP 之交互作用可能不僅限於改變病毒之累積量，也可能會影響 CymMV 細胞間移動的速率。欲證實此假設，可利用 CymMV 載體表現 ORSV MP，或以農桿菌接種法將 ORSV MP 與 CymMV 共表現，觀察病毒之移動速度及感染部位是否有改變。

根據前人研究，ORSV 與 CymMV 在 *Dendrobium* spp.與 *N. benthamiana* 之原生質體中

具有協力作用。複合感染情況下，於 *Dendrobium* spp. 原生質體中觀察到兩病毒之正股與負股 RNA 累積量均顯著高於單獨感染(Hu et al., 1998)。另外在黃裕雯學姊的實驗中，於 *N. benthamiana* 原生質體中複合感染 ORSV 與 CymMV，雖然偵測到 CymMV 之病毒 RNA 累積量提升，ORSV 之病毒 RNA 累積量卻沒有顯著改變(Huang, 2014)，顯示雖在不同寄主中兩病毒之協力作用結果並不完全相同，但仍至少有一方獲利。本研究利用農桿菌接種法共同感染 ORSV 與 CymMV 於 *N. benthamiana* 中，卻無法觀察到在病毒累積量上有協力作用發生(圖三)。比對本研究與實驗室前人研究之實驗條件，討論如下。

兩病毒複合感染在原生質體(前人)與植物體(本研究)的實驗系統，寄主均為 *N. benthamiana*，因此可排除掉不同寄主的因素；其次，原生質體與植物體的差異在於前者主要探討單細胞層次的問題，而後者則為多細胞層次，探討感染力時需同時考慮「細胞間移動」的因子。在單細胞層次，CymMV 明顯獲利(ORSV 沒有獲利)，但在多細胞層次卻沒有獲利(ORSV 也沒有)；顯示在植物體中，CymMV 於接種葉的「細胞間移動」能力可能會受到 ORSV 的影響。

延續上述討論，在 CymMV 與 ORSV 蛋白共表現的實驗中，前人研究與本研究均在接種葉上探討。前人研究 CymMV(pBIN-CymMV9)與 ORSV p126 共表現的實驗裡，CymMV 的病毒累積可受到 p126 的幫助而提升，該研究提出此協力現象可能是建立於「p126 具有高度基因靜默抑制能力」之上(Huang, 2014)。然而在前測實驗中，發現到以 pBIN-CymMV-D22 作為接種源，與 p126 或 *Tomato bushy stunt virus* p19 共同表現時，無法觀察到協力作用，或僅有非常微弱的協力作用的產生(未出示結果)。本研究中於 *N. benthamiana* 上以農桿菌接種法複合感染的實驗裡，所使用之 CymMV 感染性選殖株為 pBIN-CymMV-D22，其感染力較 pBIN-CymMV9 強(圖一)。推測可能因為 pBIN-CymMV-D22 本身較強之感染力，而使協力作用的效應不明顯。欲驗證此推論，應先確立 pBIN-



CymMV-D22 與 p126 共同表現時的病毒累積情形。前人研究 ORSV (pBIN-ORSV-Rzh-9-1) 與 CymMV TGB1 共表現的實驗裡，ORSV 的病毒累積可受到 TGB1 的幫助而提升，該研究提出此協力現象可能是建立於「TGB1 可幫助 ORSV 有更好的細胞間移動能力」之上 (Huang, 2014)。如同前一段的論述，應先確立以 pBIN-ORSV-D22 與 TGB1 共表現時病毒的累積情形，判定是否因為感染性選殖株之感染力較強，而掩蓋了協力作用的發生。此外，「TGB1 可幫助 ORSV 有更好的細胞間移動能力」之假設，無法用來解釋本實驗中 ORSV 無法受到幫助的情形，除了從感染力去解釋外，也有可能是在與 CymMV 複合感染時，TGB1 並不為 ORSV 所用；推論如下：本實驗共同表現 ORSV 與 CymMV，而非病毒 (ORSV) 與蛋白 (TGB1)；在 ORSV 與 TGB1 共表現的情況下，透過農桿菌短暫表現法，TGB1 之蛋白累積量應是遠高過由感染 CymMV 時的累積量；於此實驗方法下，ORSV 有較高的機會與 TGB1 進行交互作用；但在病毒共同感染的狀況下，不僅 TGB1 累積量可能較低，且該蛋白本身就參與在 CymMV 之移動與複製之中 (Angell et al., 1996; Tilsner et al., 2012, 2013)，在累積量不高的情況下，不見得能為 ORSV 所用，此假設可透過在不同情況下偵測 TGB1 的表現量來加以驗證 (需使用 CymMV TGB1 抗體)。

前人研究中並未測試 pBIN-ORSV-Rzh-9-1 與 pBIN-CymMV9 共表現時病毒累積的變化，若「感染力較強而使協力作用不明顯」的假設成立，則以此二較弱的感染性選殖株複合感染時，應該會產生協力作用；若否，則可能是接種葉上抑制彼此的移動，不會出現協力作用。除此之外，利用感染力較弱之 pBIN-ORSV-Rzh-9-1 與較強之 pBIN-CymMV-D22；或是 pBIN-CymMV9 與 pBIN-ORSV-D22 之組合，可觀察較弱的一方是否有受到幫助。以上推論之驗證，亦可借重病毒螢光株加以追蹤。

值得注意的是，農桿菌本身就會誘導植物的抗病反應 (Pruss et al., 2008)，ORSV 與 CymMV 是否會受到被農桿菌誘發的植物防禦反應所影響？影響的程度為何？都有可能左

右協力作用最終的結果。最後，在二者感染力均很高的情況下，亦可能會有競爭效應的產生，而使協力作用結果不明顯，甚至轉為拮抗作用(Syller and Grupa, 2016)。



4.2 複合感染時所發生之 CymMV 系統性移動

許多研究中的 CymMV 分離株可以在 *N. benthamiana* 中系統性感染(Ajjikuttira et al., 2005; Lu et al., 2009)，而本實驗室所構築之 CymMV 則不具系統性移動能力。在 Ajjikuttira 等人(2005)的報導中，TGB1 或 CP 缺失之 CymMV 分別可透過 ORSV MP 或 CP 的互補而回復其細胞間移動能力(由轉基因植物表現外源蛋白)，甚至發現 CymMV 病毒 RNA 可移動至 ORSV CP 轉基因植物之上位葉，顯示 ORSV 和 CymMV 在移動層次上存在許多交互作用(Ajjikuttira et al., 2005)。根據 Lu 等人(2009)研究，CymMV TGB1、TGB3 及 CP 上存在許多重要位點與其系統性移動相關。該篇報導之 M1 分離株中，於 TGB1 兩個胺基酸位點進行突變(Y44H、H94R)會導致系統性移動能力的喪失(Lu et al., 2009)。而本實驗室所構築之 CymMV 在 TGB1 第 44 號與第 94 號胺基酸恰好為 H (histidine)和 R (arginine)，可能是失去系統性移動能力的原因。Potexvirus 之 CP 與 TGB1 的交互作用會調控病毒之移動(Zayakina et al., 2008; Park and Kim, 2013)，胺基酸位點的突變可能導致病毒蛋白之間，甚至是與寄主之間的交互作用消失，進而影響移動能力。我們推測，ORSV 可能透過互補某些 CymMV 系統性移動重要胺基酸位點的功能，進而幫助 CymMV 系統性移動(例如：幫助 CymMV TGB1 能夠與寄主因子產生交互作用)；或是透過 ORSV 的感染先弱化植株後，CymMV 得以由侷限性感染轉變為系統性感染。在許多研究中，亦有複合感染時，某些病毒寄主範圍擴大的例子(Hacker and Fowler, 2000; Wang et al., 2004; Garcia-Cano et al., 2006)。透過螢光病毒的應用，本研究發現 CymMV 可進入葉脈，且在 ORSV 的共同感染下，更可以大量於葉脈中累積，即便螢光無法在系統葉中被觀察到，但也顯示，至少在複

合感染時，ORSV 確實有促進 CymMV 系統性移動的能力。從共表現 CymMV-eGFP 和 ORSV p126、MP、CP 或 CP^{E100A} 的實驗中，共表現任何一個蛋白或三種蛋白 (p126+MP+CP) 共表現，均無法促進 CymMV-eGFP 進入葉脈(圖十一)，顯示 ORSV 的感染過程是促進 CymMV 進入葉脈的必要條件。值得注意的是，ORSV MP 的表現量在 *N. benthamiana* 中僅維持 1 天(未出示結果)，不能排除因為 MP 表現量過低，使得三種蛋白不能共同參與在 CymMV 移動並累積至葉脈的過程；此外，ORSV p183 亦為病毒之複製酶，未來可將此蛋白列入測試。

當 ORSV 之 CP 第 100 號胺基酸由 glutamic acid (E) 突變為 alanine (A) 時，ORSV 失去於 *N. benthamiana* 中系統性移動能力 (Lin et al., 2015)。本研究發現，複合感染 CymMV 與 ORSV^{E100A} 時，不僅無法利用 ORSV CP 抗體於系統葉偵測到 ORSV CP (顯示 CymMV 無法幫助 ORSV 回復系統性移動)，也無法在系統葉偵測到 CymMV，顯示 CymMV 之系統性感染與 ORSV 之系統性感染有關；當然，也無法排除 CP^{E100A} 失去了與 CymMV 某些蛋白相互作用的能力後，失去了「促進 CymMV 移動至系統葉」的可能性。

由接種葉之病徵觀察也可獲得一些 ORSV 協助 CymMV 移動的證據。在 CymMV 單獨感染時，僅可產生白色小點，然而在複合感染 ORSV 時，病斑明顯擴大，顯示 CymMV 受到侷限的情況減弱，此病徵可能和 ORSV 促進 CymMV 移動能力有關。反之，在 ORSV^{E100A} 與 CymMV 複合感染之接種葉中則無此現象(圖六 B)。

TuMV 與 CymMV 在複合感染時，可於接種葉產生單獨感染所沒有的壞疽病斑，系統葉上也會有壞疽斑的產生，未來可觀察 CymMV 成功系統性移動的植物是否都具有該病徵。此外，PVX 與 CymMV 複合感染時，接種葉和系統葉都沒有特殊病徵；然而，卻可偵測到 50% 的複合感染植物中有 CymMV 移動至系統葉，顯示此協力現象並不與病徵發展有必然的關係。TMGMV 與 ORSV 同為 *Tobamovirus* 屬，在本次實驗的三棵複合接种植株

中，均有 CymMV 系統性感染的情況出現，未來應提升樣本數量，觀察此現象是否廣泛存在於 TMGMV 與 CymMV 複合感染植物，藉此揭示 tobamovirus 與 potexvirus 之間是否具有某種特殊的交互作用。

從共表現 CymMV-eGFP 和 TuMV HCPro 的實驗中，相較於 ORSV p126，p19、2b 和 HCPro 可提升 CymMV-eGFP 更多的螢光量；共表現 PVX p25 則比 p126 組別更弱(圖十三)，驗證了 RT-qPCR 之結果。然而 CymMV-eGFP 與任何一個 RSS 蛋白共表現，均無法促進其累積於葉脈中，顯示 CymMV 的病毒累積量與 RSS 之基因靜默抑制能力之強弱有關，但與其系統性移動無關。

4.3 ORSV p126 之基因靜默抑制能力

TMV 與 ORSV 同為 *Tobamovirus* 屬，在 Wang 等人(2012)之研究中，詳細探討 TMV p126 蛋白之基因靜默抑制能力(Wang et al., 2012)。全長之 TMV p126 為 RSS，可抑制植物的基因靜默(Ding et al., 2004)，p126 的特殊性在於此蛋白的分子量遠大於其他已知的 RSS，且整個蛋白可被區分為多個功能區(domain)，分別為 methyltransferase domain (Met)、nonconserved region I (Non I)、nonconserved region II (Non II)及 helicase domain (Hel)。研究發現，TMV 之 Met、NonII 及 Hel 單獨表現就具有抑制植物基因靜默的功能，突變試驗中發現，Met 及 Hel 的 RNA 基因靜默抑制能力與其酵素活性並不關聯，Non II 則與病徵之發展及 RNA 基因靜默抑制能力有關係(Wang et al., 2012)。

ORSV p126 之基因靜默抑制能力，在本實驗室黃裕雯學姊的論文中首度被探討，該研究發現，將四個功能區獨立分開後，均無法展現基因靜默抑制能力，也無法促進 CymMV 之病毒累積(Huang, 2014)；加上本研究中，5 種不同功能區組合的 p126 蛋白也都無法觀察到此能力，顯示 ORSV p126 蛋白需要維持全長，才能展現基因靜默抑制能力。然而此結

果仍需其他實驗來做驗證，如加入 Western blot 偵測 5 種不同功能區組合的 p126 蛋白確實有表現，GFP 之蛋白與 mRNA 累積量是否與表現 p126 的區域有明顯差異，以及將這些不同功能區組合的 p126 蛋白與 CymMV 共同表現，以驗證它們是否有參與在協力作用之中。

最後，若本實驗之結論正確，則可把研究方向指向突變 p126 之重要位點，觀察哪些突變位點會影響 p126 展現基因靜默抑制功能。

4.4 CymMV 螢光病毒株之應用

螢光病毒的應用首次發表在 1995 年，利用 PVX 重複 CP 次基因體鞘蛋白啟動子表現 GFP (Baulcombe et al., 1995)；植物病毒中使用 2A peptide 策略表現螢光蛋白則可追溯至 1996 年(Cruz et al., 1996)。螢光病毒株的運用非常廣泛，透過活體追蹤病毒感染的情形，觀察病毒的感染過程，對植物體與細胞層次的觀察都有莫大的幫助(Dietrich and Maiss, 2003)；也可以用來篩選無法抑制病毒複製的植物突變株，進而分析該突變株所缺失的基因，研究參與在病毒感染過程的重要蛋白(Minato et al., 2014; Keima et al., 2017)。

本研究參考 Minato 等人(2014)的構築策略，構築出三種可表現 eGFP 螢光之 CymMV 感染性選殖株。在 Lu 等人(2009)的文獻中曾以重複 CP 次基因體啟動子(duplicated subgenomic RNA)的方式構築可表現 GFP 之 CymMV，然而卻未能應用此材料於病毒在植物體內移動的試驗。本實驗利用農桿菌表現法，成功觀察到在 *N. benthamiana* 中由 CymMV-eGFP 所產生的螢光，並且將之與 ORSV 共同表現後，發現螢光可以累積到葉脈。目前尚待證實 CymMV 螢光病毒株與 ORSV 共同感染後，是否能夠在系統葉檢測到 CymMV 之累積；若屬實，則代表 CymMV-eGFP 在系統性感染後會丟失外源序列；若否，則可能是當基因體增大時(增加近 800 bp)，系統性移動能力受到阻礙。

另外，本研究也發現 CymMV CP 之 N 端可能和 CymMV 系統性移動及其與 ORSV 之交互作用有關，在共表現 ORSV 與 CymMV-eGFP-CP^{ES} 時，螢光無法累積到葉脈處 (CymMV-eGFP-CP^{ES} 與 EV 共表現時也不曾觀察到)；相反地，與 ORSV 共表現時，CymMV-eGFP 及 CymMV-eGFP-CP^{GP} 均可很明顯的累積至葉脈處；顯示 CP 之 N 端第二個胺基酸(glycine)與第八個胺基酸(proline)可能參與在細胞移動或系統性移動中。前人研究顯示，PVX CP 的 N 端會與 *N. benthamiana* 之 NbPCIP1 產生交互作用而增強病毒累積量，該交互作用亦可能與病毒的細胞間移動有關(Park and Kim, 2013)，據此，CymMV CP 的 N 端突變株也可能失去了和寄主交互作用的能力，而影響其感染力及系統性移動能力。欲研究此現象，可將野生型的 CymMV CP 改為 CP^{ES}，與 ORSV 複合感染後，觀察此 CymMV 突變株是否有系統性移動的發生。

4.5 結語

本研究發現，即便在病毒累積層次之協力作用不明顯，ORSV 與 CymMV 複合感染時仍可以造成較強的病徵，甚至使得 CymMV 獲得系統性移動的能力，顯示二者之協力作用也包含了移動層次的幫助。CymMV 在與 TuMV、PVX、TMGMV 複合感染時，均可移動至系統葉，然而存在著比率上的差異，顯示 CymMV 與這些病毒之交互作用機制的不同，也可能進一步顯示 tobamovirus 與 potexvirus 之間存在著特殊的關係。透過螢光病毒的應用，方便我們觀察不同病毒與 CymMV 在累積量與系統性移動層次上是否具有交互作用。本研究利用此法，證實 CymMV 雖然會受到不同的病毒基因靜默抑制子的幫助，在接種葉提高累積量，卻無法藉此獲得系統性移動能力，顯示 CymMV 病毒累積量的上升，以及多種外源病毒基因靜默抑制子單獨存在的情況下，並不足以使 CymMV 回復系統性感染。

5. 參考文獻



張清安 (2006)。蘭花病毒之診斷、鑑定與偵測。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊 (五)。

Ajjikuttira, P., Loh, C.-S., and Wong, S.-M. (2005). Reciprocal function of movement proteins and complementation of long-distance movement of *Cymbidium mosaic virus* RNA by *Odontoglossum ringspot virus* coat protein. *J. Gen. Virol.* 86: 1543-1553.

Ali, R.N., Dann, A.L., Cross, P.A., and Wilson, C.R. (2014). Multiplex RT-PCR detection of three common viruses infecting orchids. *Arch. Virol.* 159: 3095-3099.

An, G., Ebert, P., Mitra, A., and Ha, S. (1988). Binary vectors. Gelvin, S.B. Schilperoort, R.A., Verma, D.P.S. *Plant Mol. Biol. Man.* vol A3. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, pp. 1-19.

Angell, S.M., Davies, C., and Baulcombe, D.C. (1996). Cell-to-cell movement of *Potato virus X* is associated with a change in the size-exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology* 216: 197-201.

Baulcombe, D.C., Chapman, S., and Santa Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* 7: 1045-1053.

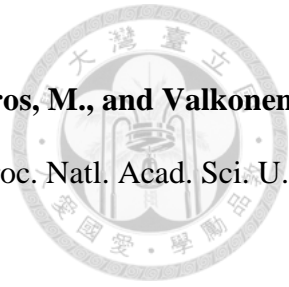
Brosseau, C. and Moffett, P. (2015). Functional and genetic analysis identify a role for *Arabidopsis* ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. *Plant Cell* 27: 1742-1754.

Chapman, S., Kavanagh, T., and Baulcombe, D. (1992). *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* 2: 549-557.

Chiu, M.H., Chen, I.H., Baulcombe, D.C., and Tsai, C.H. (2010). The silencing suppressor P25 of *Potato virus X* interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.* 11: 641-649.

Cruz, S.S., Chapman, S., Roberts, A.G., Roberts, I.M., Prior, D.A., and Oparka, K.J. (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein

overcoat. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93: 6286-6290.



Cuellar, W.J., Kreuze, J.F., Rajamaki, M.-L., Cruzado, K.R., Untiveros, M., and Valkonen, J.P.T. (2009). Elimination of antiviral defense by viral RNase III. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106: 10354-10358.

Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., and Moreno, P. (2015). *Citrus tristeza virus*: making an ally from an enemy. Annu. Rev. Phytopathol. 53: 137-155.

Dietrich, C. and Maiss, E. (2003). Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. J. Gen. Virol. 84: 2871-2876.

Ding, S.W. and Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. Cell 130: 413-426.

Ding, X.S., Liu, J., Cheng, N.-H., Folimonov, A., Hou, Y.-M., Bao, Y., Katagi, C., Carter, S.A., and Nelson, R.S. (2004). The *Tobacco mosaic virus* 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. Mol. Plant. Microbe. Interact. 17: 583-592.

Donnelly, M.L., Hughes, L.E., Luke, G., Mendoza, H., tenDam, E., Gani, D., and Ryan, M.D. (2001). The “cleavage” activities of *Foot-and-mouth disease virus* 2A site-directed mutants and naturally occurring “2A-like” sequences. J. Gen. Virol. 82: 1027-1041.

Ebhardt, H.A., Thi, E.P., Wang, M.B., and Unrau, P.J. (2005). Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 13398-13403.

Epel, B.L., Padgett, H.S., Heinlein, M., and Beachy, R.N. (1996). Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion. Gene 173: 75-79.

Garcia-Cano, E., Resende, R.O., Fernandez-Munoz, R., and Moriones, E. (2006). Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results

in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* 96: 1263-1269.

Gonzalez-Jara, P., Atencio, F.A., Martinez-Garcia, B., Barajas, D., Tenllado, F., and Diaz-Ruiz, J.R. (2005). A single amino acid mutation in the *Plum pox virus* helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology* 95: 894-901.

Gonzalez-Jara, P., Tenllado, F., Martinez-Garcia, B., Atencio, F.A., Barajas, D., Vargas, M., Diaz-Ruiz, J., and Diaz-Ruiz, J.R. (2004). Host-dependent differences during synergistic infection by potyviruses with *Potato virus X*. *Mol. Plant Pathol.* 5: 29-35.

Hacker, D.L. and Fowler, B.C. (2000). Complementation of the host range restriction of *Southern cowpea mosaic virus* in bean by *Southern bean mosaic virus*. *Virology* 266: 140-149.

He, A.L. (2012). Analysis and application of the capsid protein subgenomic promotor of *Pitaya virus X*. Master Thesis.

Heinlein, M., Epel, B.L., Padgett, H.S., and Beachy, R.N. (1995). Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270: 1983-1985.

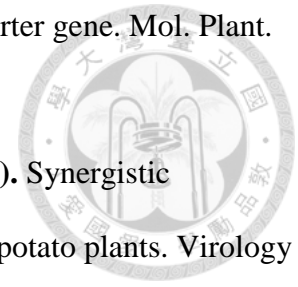
Hisa, Y., Suzuki, H., Atsumi, G., Choi, S.H., Nakahara, K.S., and Uyeda, I. (2014). P3N-PIPO of *Clover yellow vein virus* exacerbates symptoms in pea infected with *White clover mosaic virus* and is implicated in viral synergism. *Virology* 449: 200-206.

Hu, W.W., Wong, S.M., Goh, C.J., and Loh, C.S. (1998). Synergism in replication of *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) RNA in orchid protoplasts. *Arch. Virol.* 143: 1265-1275.

Huang, Y.W. (2014). Synergism in infectivity between *Odontoglossum ringspot virus* and *Cymbidium mosaic virus*. Master Thesis.

Karran, R.A. and Sanfacion, H. (2014). *Tomato ringspot virus* coat protein binds to

ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 27: 933-943.



Karyeija, R.F., Kreuze, J.F., Gibson, R.W., and Valkonen, J.P. (2000). Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology* 269: 26-36.

Keima, T., Hagiwara-Komoda, Y., Hashimoto, M., Neriya, Y., Koinuma, H., Iwabuchi, N., Nishida, S., Yamaji, Y., and Namba, S. (2017). Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant virus encoding triple-gene-block proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 7: 39678.

King, A.M.Q., Elliot Lefkowitz, M.J.A., and Carstens, E.B. (2011). Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

Koh, K.W., Lu, H.-C., and Chan, M.-T. (2014). Virus resistance in orchids. *Plant Sci.* 228: 26-38.

Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., and Burgyan, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.* 23: 876-884.

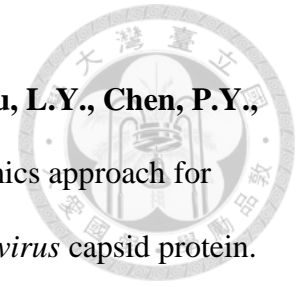
Latham, J.R. and Wilson, A.K. (2008). Transcomplementation and synergism in plants: implications for viral transgenes? *Mol. Plant Pathol.* 9: 85-103.

Lee, S.-C. (2008). Development of detection methods for two important orchid viruses, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), and construction and characterization of an ORSV infectious cDNA clone. Master thesis.

Lee, S.-C. and Chang, Y.-C. (2006). Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant *nad5* mRNA. *Plant Pathol. Bull.* 15: 187-196.

Lee, S.-C. and Chang, Y.-C. (2008). Performances and application of antisera produced by recombinant capsid proteins of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*.

Eur. J. Plant Pathol.



Lin, P.C., Hu, W.C., Lee, S.C., Chen, Y.L., Lee, C.Y., Chen, Y.R., Liu, L.Y., Chen, P.Y.,

Lin, S.S., and Chang, Y.C. (2015). Application of an integrated omics approach for identifying host proteins that interact with *Odontoglossum ringspot virus* capsid protein.

Mol Plant Microbe Interact 28: 711-726.

Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D., and Zhang, Y. (2012). Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. PLoS One 7: e46451.

Liu, H.L., Liu, Y.W., Shen, T.L., Hsu, C.H., and Chang, Y.C. (2016). Characterization and application of a common epitope recognized by a broad-spectrum C4 monoclonal antibody against capsid proteins of plant potyviruses. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100: 1853-1869.

Lu, H.C., Chen, C.E., Tsai, M.H., Wang, H.I., Su, H.J., and Yeh, H.H. (2009). *Cymbidium mosaic potexvirus* isolate-dependent host movement systems reveal two movement control determinants and the coat protein is the dominant. Virology 388: 147-159.

Lu, H.C., Chen, H.H., Tsai, W.C., Chen, W.H., Su, H.J., Chang, D.C., and Yeh, H.H. (2007). Strategies for functional validation of genes involved in reproductive stages of orchids. Plant Physiol. 143: 558-569.

Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.-X., Falk, B.W., Dawson, W.O., and Ding, S.-W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 15742-15747.

Mascia, T. and Gallitelli, D. (2016). Synergies and antagonisms in virus interactions. Plant Sci. 252: 176-192.

Minato, N., Komatsu, K., Okano, Y., Maejima, K., Ozeki, J., Senshu, H., Takahashi, S., Yamaji, Y., and Namba, S. (2014). Efficient foreign gene expression in planta using a

Plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. Arch. Virol. 159: 885-896.



Mochizuki, T., Nobuhara, S., Nishimura, M., Ryang, B.-S., Naoe, M., Matsumoto, T.,

Kosaka, Y., and Ohki, S.T. (2016). The entry of *Cucumber mosaic virus* into cucumber xylem is facilitated by co-infection with *Zucchini yellow mosaic virus*. Arch. Virol.

Padgett, H.S., Epel, B.L., Kahn, T.W., Heinlein, M., Watanabe, Y., and Beachy, R.N. (1996).

Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. Plant J. 10: 1079-1088.

Park, M.-R. and Kim, K.-H. (2013). Molecular characterization of the interaction between the

N-terminal region of *Potato virus X* (PVX) coat protein (CP) and *Nicotiana benthamiana* PVX CP-interacting protein, NbPCIP1. Virus Genes 46: 517-523.

Pearson, M.N. and Cole, J.S. (1991). Further observations on the effects of *Cymbidium mosaic*

virus and *Odontoglossum ringspot virus* on the growth of *Cymbidium* orchids. J. Phytopathol. 131: 193-198.

Petty, I.T., Hunter, B.G., Wei, N., and Jackson, A.O. (1989). Infectious *Barley stripe mosaic*

virus RNA transcribed in vitro from full-length genomic cDNA clones. Virology 171: 342-349.

Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C., and Bowman Vance, V. (1997). Plant viral

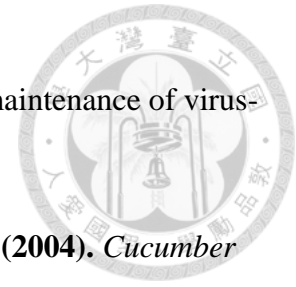
synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. Plant Cell 9: 859-868.

Pruss, G.J., Nester, E.W., and Vance, V. (2008). Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens*

induces host defense and development-dependent responses in the infiltrated zone. Mol. Plant. Microbe. Interact. 21: 1528-1538.

Rochow. W and Ross. F (1955). Virus multiplication in plants doubly infected by Potato viruses

X and Y. *Virology* 1: 10-27.



Ruiz, M.T., Voinnet, O., and Baulcombe, D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10: 937-946.

Ryang, B.-S., Kobori, T., Matsumoto, T., Kosaka, Y., and Ohki, S.T. (2004). *Cucumber mosaic virus* 2b protein compensates for restricted systemic spread of *Potato virus Y* in doubly infected tobacco. *J. Gen. Virol.* 85: 3405-3414.

Siddiqui, S.A., Valkonen, J.P.T., Rajamaki, M.-L., and Lehto, K. (2011). The 2b silencing suppressor of a mild strain of *Cucumber mosaic virus* alone is sufficient for synergistic interaction with *Tobacco mosaic virus* and induction of severe leaf malformation in 2b-transgenic tobacco plants. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24: 685-693.

Srinivasan, R. and Alvarez, J.M. (2007). Effect of mixed viral infections (*Potato virus Y*-*Potato leafroll virus*) on biology and preference of vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 100: 646-655.

Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol. Plant Pathol.* 13: 204-216.

Syller, J. and Grupa, A. (2016). Antagonistic within-host interactions between plant viruses: molecular basis and impact on viral and host fitness. *Mol. Plant Pathol.* 17: 769-782.

Tilsner, J., Linnik, O., Louveaux, M., Roberts, I.M., Chapman, S.N., and Oparka, K.J. (2013). Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. *J. Cell Biol.* 201: 981-995.

Tilsner, J., Linnik, O., Wright, K.M., Bell, K., Roberts, A.G., Lacomme, C., Santa Cruz, S., and Oparka, K.J. (2012). The TGB1 movement protein of *Potato virus X* reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. *Plant Physiol.* 158: 1359-1370.

Turpen, T.H., Turpen, A.M., Weinzettl, N., Kumagai, M.H., and Dawson, W.O. (1993).

Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of *Tobacco mosaic virus*. J. Virol. Methods 42: 227-239.

Untiveros, M., Fuentes, S., and Salazar, L.F. (2007). Synergistic interaction of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (Crinivirus) with *Carla*-, *Cucumo*-, *Ipomo*-, and *Potyvirus*es infecting sweet potato. Plant Dis.

Vance, V.B. (1991). Replication of *Potato virus X* RNA is altered in coinfections with *Potato virus Y*. Virology 182: 486-494.

Vance, V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G., and Shi, X.M. (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate *Potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. Virology 206: 583-590.

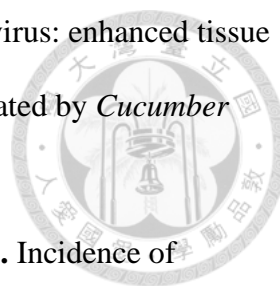
Vieira, J. and Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. Methods Enzymol. 153: 3-11.

Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. Nature 389: 553.

Voinnet, O., Lederer, C., and Baulcombe, D.C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. Cell 103: 157-167.

Wang, L.Y., Lin, S.S., Hung, T.H., Li, T.K., Lin, N.C., and Shen, T.L. (2012). Multiple domains of the *Tobacco mosaic virus* p126 protein can independently suppress local and systemic RNA silencing. Mol Plant Microbe Interact 25: 648-657.

Wang, Y., Lee, K.C., Gaba, V., Wong, S.M., Palukaitis, P., and Gal-On, A. (2004). Breakage of resistance to *Cucumber mosaic virus* by co-infection with *Zucchini yellow mosaic virus*: enhancement of CMV accumulation independent of symptom expression. Arch. Virol. 149: 379-396.



- Wege, C. and Siegmund, D. (2007).** Synergism of a DNA and an RNA virus: enhanced tissue infiltration of the begomovirus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) mediated by *Cucumber mosaic virus* (CMV). *Virology* 357: 10-28.
- Wong, S.M., Chng, C.G., Lee, Y.H., Tan, K., and Zettler, F.W. (1994).** Incidence of *Cymbidium mosaic* and *Odontoglossum ringspot* viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. *Crop Prot.* 13: 235-239.
- Yao, J.Y. (2011).** Studies on *Tobacco mild green mosaic virus* and construction of a TMGMV-based vector. Master Thesis.
- Zayakina, O., Arkhipenko, M., Kozlovsky, S., Nikitin, N., Smirnov, A., Susi, P., Rodionova, N., Karpova, O., and Atabekov, J. (2008).** Mutagenic analysis of *Potato virus X* movement protein (TGBp1) and the coat protein (CP): in vitro TGBp1-CP binding and viral RNA translation activation. *Mol. Plant Pathol.* 9: 37-44.
- Zettler, F.W., Ko, N.-J., Wisler, G.C., Elliott, M.S., and Wong, S.-M. (1990).** Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74: 621-626.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., and Chua, N.H. (2006).** *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20: 3255-3268.

6. 附表



表一、本研究中使用之引子

Table 1. Primers used in this study

引子名稱	序列(5'→3') ^a
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT
35S-R	GGCTGTCCTCTCCAAATGAAA
ORSV-D22-R	CGTCCTTTCGCTATTAAGCATTGCCA
ORSV-F1	GTATTGTTTCGATTACTACAATTACAA
Cy-AhdI-F	AGAAATAGCGCCACTCAGCTT
Cy-AhdI-R	GGACCAATTCCCGTATCTTGT
dT-SpeI-SbfI	ATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCACTAGTTTTTTTTTTTT TTTTTT
CymMV-CPR2	CTACGCAAAGTGGTGTGGAATCTGA
CymMV-SmaI-F	CACTCCAACCTCCCGGGAGCTGCCACTTACTCC
CymMV-SmaI-R	AGTAAGTGGCAGCTCCCGGGAGTTGGAGTGGGCTCT
eGFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT
eGFP-AvrII-2An-R	TCTCCCGCAAGCTTAAGAAGGTCAAATTCCCTAGGCTTGACAGC TCGTCCAT
CyCP-2Ac-F	TTAAGCTTGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCGGAGAG CCCACTCCAAC
Cy-HpaI-R	TAGGTACCGCGGCCATTGA
CymMV-TGB1F2	ATGGAGCTAGCGTACTTAGTTAG
CyCP-GP-F	GGTGA <u>ACC</u> GAC <u>ACCT</u> TAC <u>ACCT</u> GCTGCCACTTA
2ACyCP-GP-R	<u>AGG</u> TGT <u>AGG</u> TGTC <u>GGT</u> TC <u>ACC</u> GGGCCAGGGTT

CyCP-ES-F	GAGGA <u>ACCGAC</u> ACCTACAAGTGCTGCCACTTA
2ACyCP-ES-R	ACTTGTAGGTGT <u>CGGTTCTC</u> GGGCCCAGGGTT
ORSV-p126-F1	ATGGCACACTTCCAACAAACAATG
ORSV-p126-NonI-5'	ATGCATAAGGAATTTATGTGCACCAG
ORSV-p126-NonI-3'	TCTGTGTTACAGGCGTTATCT
ORSV-p126-NonII-5'	ATGACTTTTCTTTTACAGACGAAG
ORSV-p126-NonII-3'	CTTCAGATTCCCTTATTTATTCAGAT
ORSV-p126-R2	GTATAAGGTCGATGCCGGGATCTTA
ORSV-MPF2	ATGGCTCTAGTACTAAGGGATA
ORSV-MPR2	ATACGAATCAGATTGTGCGTCAAA
ORSV-CPF1	ATGTCTTACACTATTACAGACCCG
ORSV-CPR-nonStop	GGAAGAGGTCCAAGTAAGTCCA
TuMV-HC-F	ATGAGTGCAGCAGGAGCCAACCTTCT
TuMV-HC-R	TCCGACGCGGTAGTGTTTCAA
CMV2b-F	ATGGATGTGTTGACAGTAGTGGT
CMV2b-R	AAACGACCCTTCGGCCCATTC
PVX-P25-F	ATGGATATTCTCATCAGTAGTTTGAAAAG
PVX-P25-R3	TGGCCCTGCGCGGACATATGTCA
qORSV-F4	CCGTACCTATCAAGACAAAGCC
qORSV-R4	ACAAACCCACCGCTAATGAG
qCymMV-145F	TAAAGAGGTGAGCGAACGGG
qCymMV-145R	ATACGAAGATACGGAGGAAAGGTG

qNbPP2A-F	GACCCTGATGTTGATGTTTCGCT
qNbPP2A-R	GAGGGATTTGAAGAGAGATTTC
dT-VN ^b	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN



^a Letters with gray background indicate restriction enzyme sites. Uppercase italics indicate part of 2A peptide of Foot-and-mouth disease virus. Underlined letters indicate mutations introduced in the first 21 nucleotides of CymMV CP.

^bV=A, C, or G; N= A, T, C, or G

表二、CymMV 與不同病毒複合感染之系統性移動比率



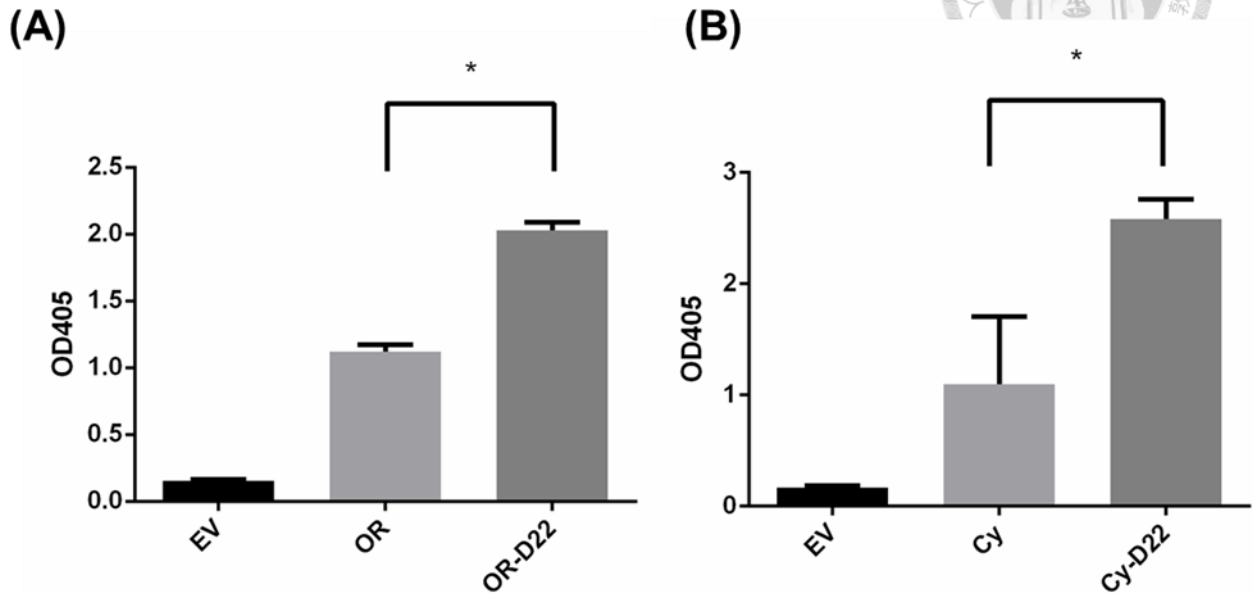
Table 2. Systemic infection of CymMV in mix-infected *N. benthamiana* inoculated by CymMV and different viruses.

	Co-infecting viruses ^b	Number of plants inoculated	Number of plants were CymMV-infected	Systemic infection of CymMV(%)
CymMV ^a	ORSV	5	5	100
	ORSV ^{E100A}	3	0	0
	TuMV	30	17	52.6
	PVX	8	4	50
	TMGMV	3	3	100

^a CymMV=*Cymbidium mosaic virus*

^b ORSV=*Odontoglossum ringspot virus*; ORSV^{E100A}=ORSV with substitution of glutamic acid to alanine at position 100 of capsid protein; TuMV=*Turip mosaic virus*; PVX=*Potato virus X*; TMGMV=*Tobacco mild green mosaic virus*.

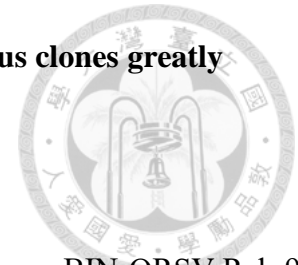
7. 附圖



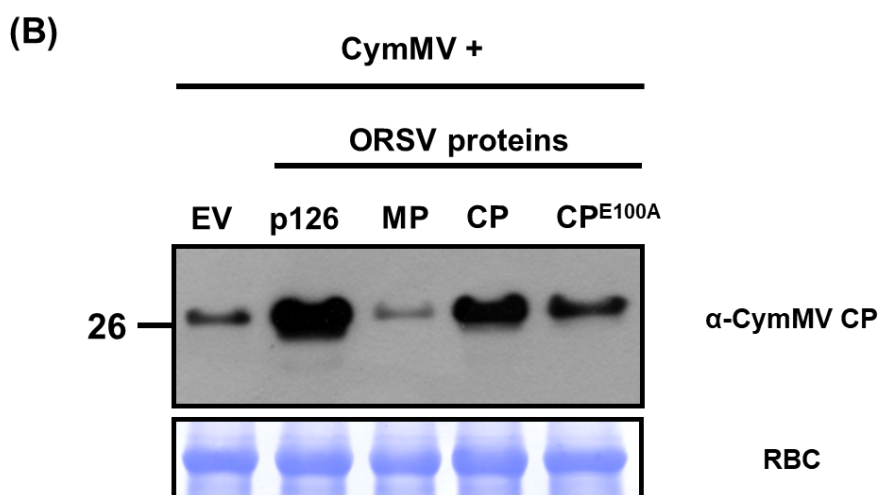
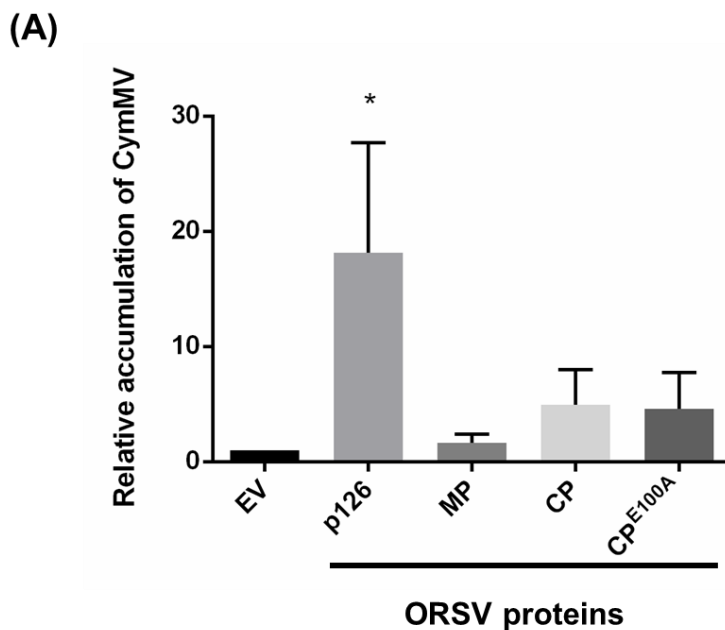
圖一、去除感染性選植株中之非病毒序列可明顯提升感染力

(A)以 pBIN-ORSV-Rzh-9-1 (OR)或 pBIN-ORSV-D22 (OR-D22)為接種源，利用農桿菌接種法表現於 *Nicotiana benthamiana*，並以間接式酵素連結免疫吸附法(I-ELISA)偵測 6 天後接種葉之 ORSV CP 累積量，EV 為表現空載體之對照組；以 OD₄₀₅ 偵測讀值；偵測時間為 60 分鐘。(B)方法如上，以 pBIN-CymMV9 (Cy)或 pBIN-CymMV-D22 (Cy-D22)作為接種源，以 I-ELISA 偵測 4 天後接種葉之 CymMV CP 累積量。EV 為表現空載體之對照組。星號(*)代表該組別與 EV 有顯著差異(雙尾；學生 *t* 檢定法，*代表 P<0.05)

Fig 1. Removal of nonviral sequences of ORSV and CymMV infectious clones greatly increased the infectivity



(A) *N. benthamiana* leaves were agro-inoculated with different virus clones, pBIN-ORSV-Rzh-9-1 (OR) or pBIN-ORSV-D22 (OR-D22). Inoculated leaves were harvested at 6 dpi and subjected to ELISA test to analyze capsid protein accumulation of ORSV. OD₄₀₅ was obtained after 60 minutes. Empty vector (EV) was expressed as background control. (B) As mentioned in (A), *N. benthamiana* leaves were agro-inoculated with CymMV infectious clone, pBIN-CymMV9 (Cy) or pBIN-CymMV-D22 (Cy-D22). Inoculated leaves were harvested at 4 dpi and subjected to ELISA test to analyze capsid protein accumulation of CymMV. Asterisk indicates significant difference compared with OR or Cy (two-tailed Student's *t*-test, asterisk; $P < 0.05$)



圖二、表現 ORSV 之 p126、MP、CP 及 CP^{E100A} 蛋白對 CymMV 累積量之影響

以農桿菌接種法共表現蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)及不同的齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)蛋白於圓葉菸草(*Nicotiana benthamiana*)中：

p126 蛋白、移動蛋白(movement protein, MP)，鞘蛋白(capsid protein, CP)及 CP 第 100 號胺基酸由 glutamic acid 突變為 alanine 之 CP^{E100A} (Lin et al., 2015)，於接種後 3 天收取接種葉

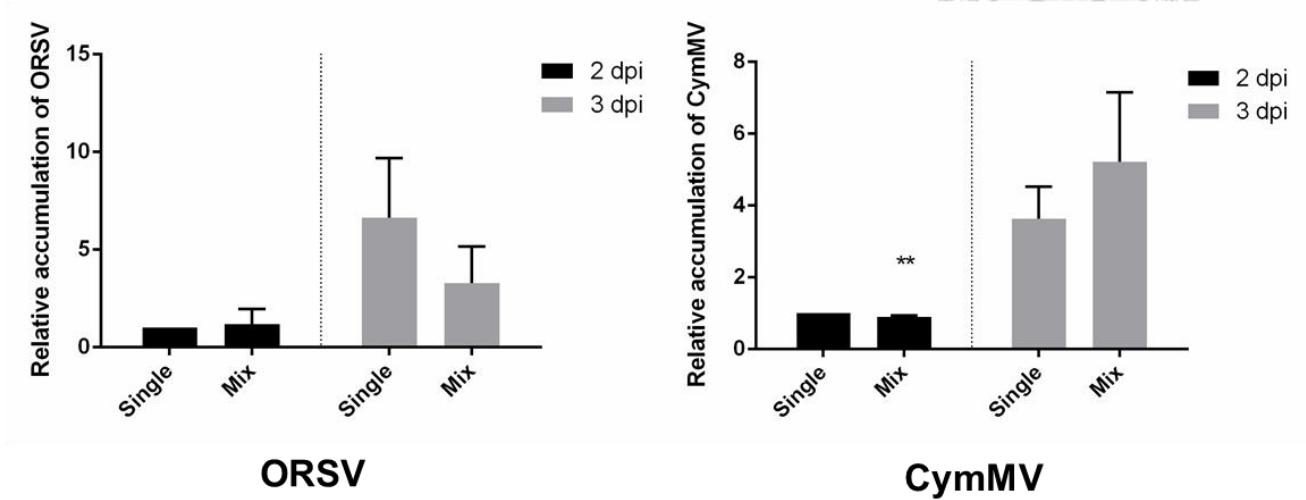
進行分析。(A)以反轉錄即時定量聚合酶鏈鎖反應(RT-qPCR)偵測 CymMV 病毒 RNA 含

量，使用 CymMV RdRp 專一性引子對 (qCymMV-145F/qCymMV-145R)，以菸草 protein phosphatase 2A 基因作為 internal control 進行標準化，將 EV 之 CymMV 表現量作為基準點 (1.0)。星號(*)代表該組別與 EV 有顯著差異(雙尾；學生 *t* 檢定法，*代表 $P < 0.05$)。(B)以 Western blot 分析 CymMV 鞘蛋白之累積。以 Coomassie brilliant blue G-250 對 PVDF 膜進行染色，將 rubisco (RBC)作為 loading control。EV 為不表現 ORSV 蛋白的對照組。

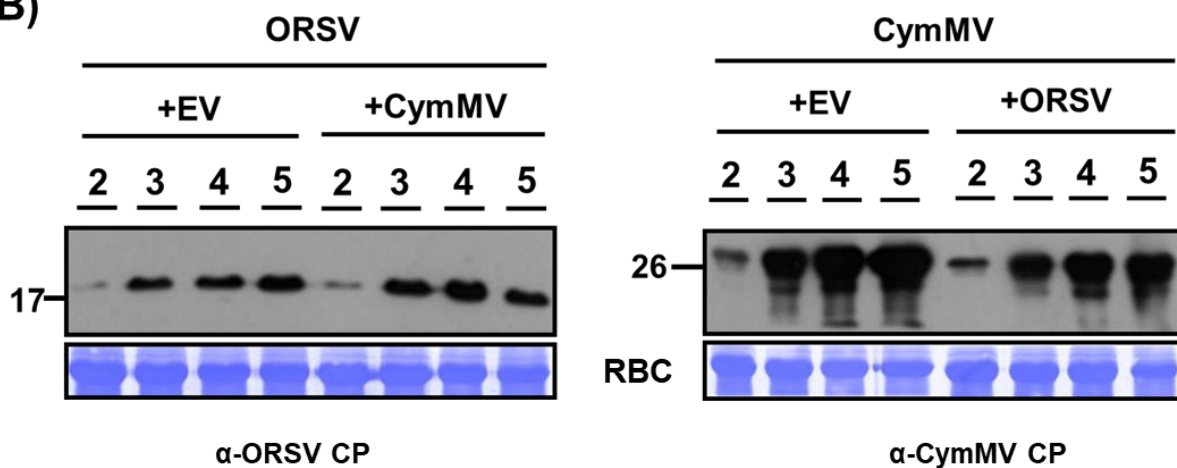
Fig 2. The effect of co-expressed ORSV p126, MP, CP and CP^{E100A} on CymMV accumulation.

CymMV and different ORSV proteins were co-expressed on *Nicotiana benthamiana* by agro-infiltration, and the infiltrated leaves were harvested and subjected to analysis at 3 dpi. (A) Reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to quantify CymMV viral RNA accumulation. Viral RNA was amplified by CymMV-specific primers targeting RdRp gene (qCymMV-145F/qCymMV-145R). The values were normalized against protein phosphatase 2A of *N. benthamiana* as control gene. The level of viral RNA in EV was used as the standard (1.0). Asterisk indicates significant difference compared with EV (two-tailed Student's *t*-test, asterisk; $P < 0.05$). (B) Western blot was used to analyze the accumulation of CymMV capsid protein. PVDF was stained by Coomassie brilliant blue G-250, and rubisco (RBC) was served as loading control. EV: empty vector control.

(A)



(B)



圖三、比較 ORSV 與 CymMV 單獨與複合感染於圓葉菸草之病毒累積量

以農桿菌接種法，分別單獨接種 ORSV 或 CymMV (Single)，及複合接種 ORSV+CymMV

(Mix) 於圓葉菸草，並對接種葉進行分析。(A)於接種後 2、3 天收取接種葉，以 RT-qPCR

偵測 ORSV 及 CymMV 病毒 RNA 含量，使用 ORSV p126 專一性引子對(qORSV-

F4/qORSV-R4)以及 CymMV RdRp 專一性引子對 (qCymMV-145F/qCymMV-145R)，以菸草

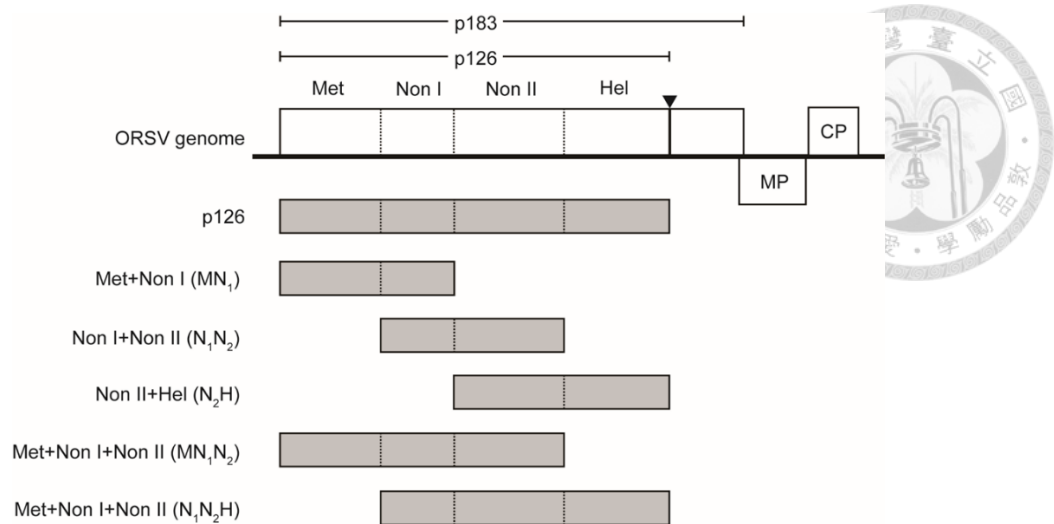
protein phosphatase 2A 基因作為 internal control 進行標準化，將單獨接種 ORSV 或

CymMV 之植株於接種後 2 天之表現量作為基準點(1.0)。左圖為偵測 ORSV 病毒 RNA，右圖為偵測 CymMV 病毒 RNA。星號(*)代表該組別與單獨接種後 2 天之病毒表現量有顯著差異(雙尾；學生 *t* 檢定法，**代表 $P < 0.01$)。(B)於接種後 2~5 天收取葉片，以 Western blot 分析 ORSV 與 CymMV 鞘蛋白之累積。以 Coomassie brilliant blue G-250 對 PVDF 膜進行染色，將 rubisco (RBC)作為 loading control。

Fig 3. Comparison of ORSV and CymMV accumulation in singly or doubly infected

***Nicotiana benthamiana*.**

ORSV and CymMV were singly or doubly inoculated to *Nicotiana benthamiana* by agro-infection, the inoculated leaves were harvested and subjected to analysis. (A) RT-qPCR was used to quantify ORSV and CymMV viral RNA accumulation at 2 and 3 dpi. Viral RNA was amplified by ORSV-specific primers targeting p126 (qORSV-F4/qORSV-R4) or CymMV-specific primers targeting RdRp (qCymMV-145F/qCymMV-145R). The values were normalized against protein phosphatase 2A as control gene. The level of viral RNA in singly infected plants at 2 dpi was used as the standard (1.0). The relative accumulation level of ORSV (left panel) and CymMV (right panel) among treatments were shown. Asterisk indicates significant difference compared with the singly infected plants at 2 dpi (two-tailed Student's *t*-test, asterisk; $P < 0.05$). (B) Western blot was used to analyze the accumulation of ORSV or CymMV capsid protein. PVDF was stained by Coomassie brilliant blue G-250, and rubisco (RBC) was served as loading control.

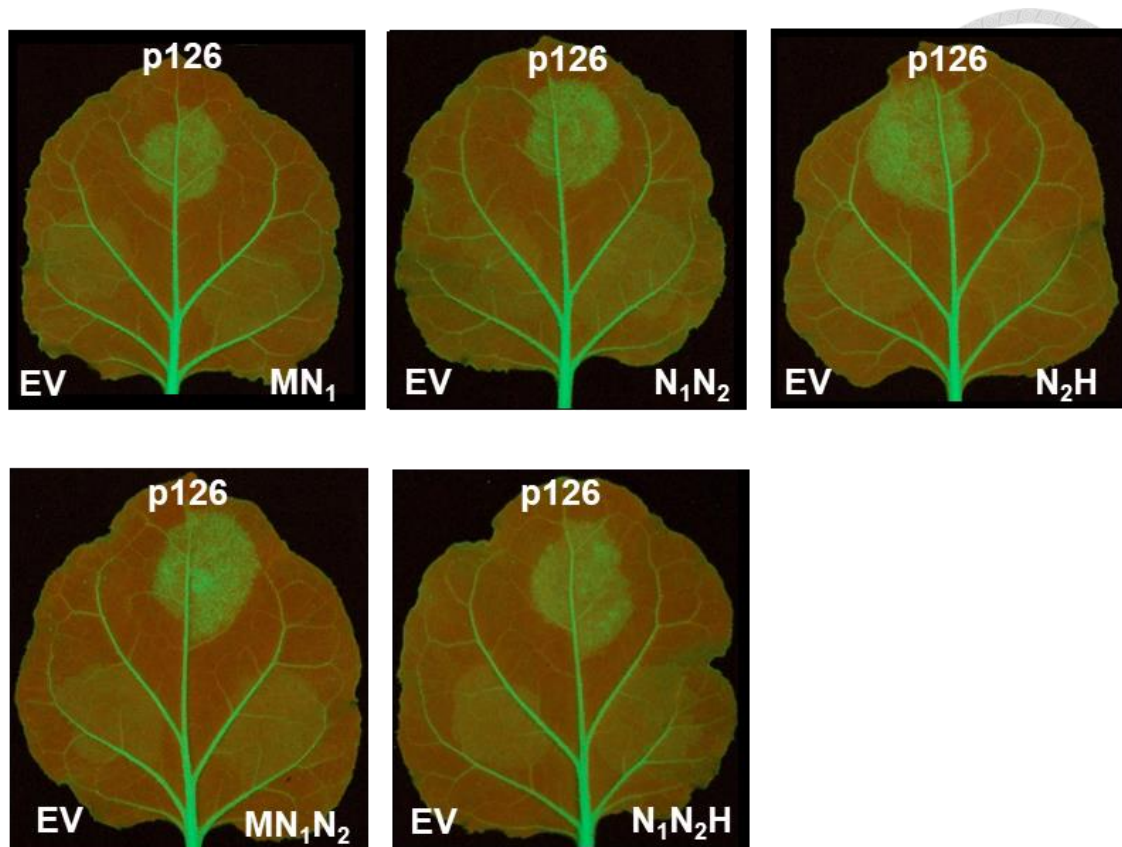


圖四、ORSV 基因體結構與五種不同功能區(domains)組合之 p126 示意圖

將組成 p126 蛋白之功能區以二或三個相互連結的方式組合，形成 MN_1 、 N_1N_2 、 N_2H 、 MN_1N_2 及 N_1N_2H 五種不同 p126 片段，並將之構築於 pBIN61-myc-ko 質體中(Huang, 2014)。各蛋白 C 端均結合 c-myc 與 ko tag 作為蛋白偵測使用。p126：全長 ORSV p126 蛋白；Met: Methyltransferase domain；Non I: Nonconserved region I；Non II: Nonconserved region II；Hel: Helicase domain；MP: movement protein；CP: capsid protein；▼：p126 蛋白基因之轉譯停止子(TAG)。

Fig 4. Schematic representation of the *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) genome organization and five p126 derivatives with different domain combinations.

Four described p126 domains are combined with neighboring domains to construct five p126 derivatives, MN_1 , N_1N_2 , N_2H , MN_1N_2 and N_1N_2H . These fragments were constructed to pBIN61-myc-ko (Huang, 2014). Each protein contains c-myc and ko tags at the C-terminus for protein detection. p126: full-length ORSV p126 protein; Met: Methyltransferase domain; Non I: Nonconserved region I; Non II: Nonconserved region II; Hel: Helicase domain; MP: movement protein; CP: capsid protein. The stop codon (TAG) of p126 gene is indicated by black triangle (▼).



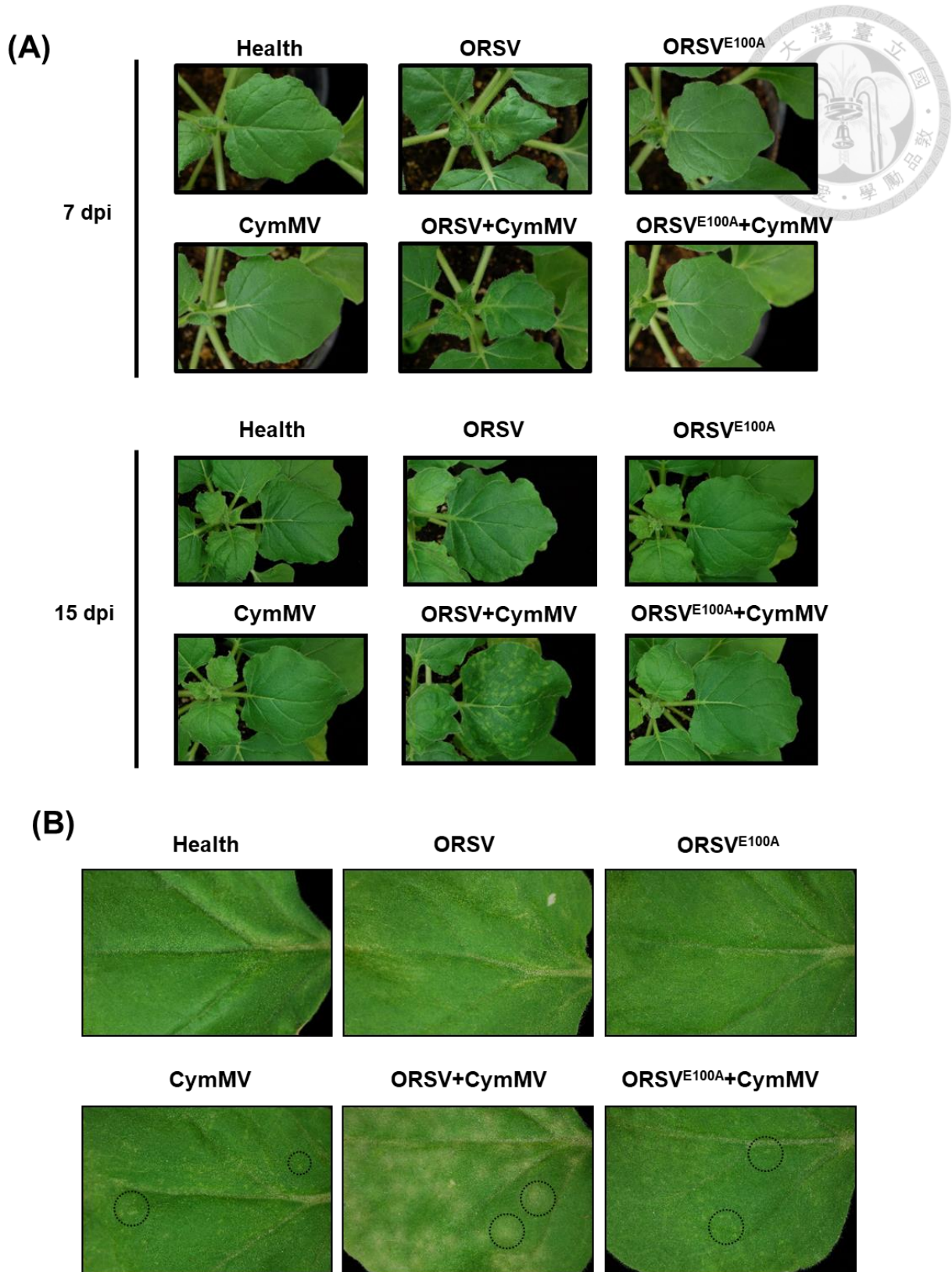
圖五、不同功能區組合之 ORSV p126 蛋白之 RNA 基因靜默抑制能力測試

共表現 pBIN-GFP 與空載體(EV)或 5 種不同功能區組合之 ORSV p126 於 GFP 轉基因圓葉菸草(*N. benthamiana* line 16c)，接種後 4 天以手持式 UV 燈激發螢光並拍照紀錄。p126 為正對照組。MN₁: Methyltransferase domain + Nonconserved region I; N₁N₂: Nonconserved region I + Nonconserved region II; N₂H: Nonconserved region II + Helicase domain; MN₁N₂: Methyltransferase domain + Nonconserved region I + Nonconserved region II; N₁N₂H: Nonconserved region I + Nonconserved region II + Helicase domain。


Fig 5. RNA silencing suppression abilities of different domain combinations of ORSV p126 in *N. benthamiana* line 16c.

Leaves of *N. benthamiana* line 16c were agro-infiltrated with the pBIN-GFP along with five different domain combinations of ORSV p126, or empty vector (EV). Full-length p126 was

included as positive control (Huang, 2014). Leaves were photographed at 4 dpi under UV illumination. **MN₁**: Methyltransferase domain + Nonconserved region I ; **N₁N₂**: Nonconserved region I + Nonconserved region II; **N₂H**: Nonconserved region II + Helicase domain; **MN₁N₂**: Methyltransferase domain + Nonconserved region I + Nonconserved region II; **N₁N₂H**: Nonconserved region I + Nonconserved region II + Helicase domain.



圖六、ORSV 與 CymMV 單獨和複合感染圓葉菸草於接種葉與系統葉所引起之病徵



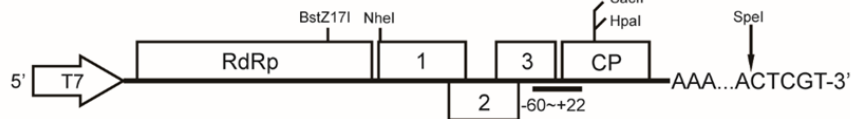
利用罹病植物組織對健康圓葉菸草進行汁液接種，於植株3周大(第8片本葉展開)時，接種於第3~5片本葉。(A)於接種後7天與15天記錄系統葉病徵。ORSV於第7天即可見嵌紋與捲葉病徵。ORSV及CymMV複合接種後15天，在第8~12片本葉位置出現斑駁(mottle)病徵。(B)接種後15天紀錄接種葉病徵。圓圈指示處為CymMV在圓葉菸草上引起之白點或褪綠塊斑病徵。Health為以健康植物汁液接種之植物。

Fig 6. The symptoms of inoculated and systemic leaves induced by single and mixed infection of ORSV and CymMV on *N. benthamiana*.

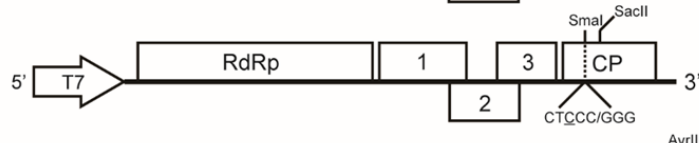
Crude extracts of virus-infected or healthy plants were applied mechanically to 3th to 5th true leaves of eight-leaf stage *N. benthamiana* plants (about 3 weeks old). (A) Symptoms on systemic leaves were photographed at 7 and 15 dpi. Mosaic and leaf curling caused by ORSV was observed on systemic leaves at 7 dpi. Mottling symptoms appeared on 8th to 12th systemic leaves of ORSV+CymMV treatment at 15 dpi. B. Symptoms on inoculated leaves were photograph at 15 dpi. The circles indicate white spots or chlorotic blotches caused by CymMV on *N. benthamiana* inoculated leaves. “Health” refers to plants inoculated with virus-free saps.

(A)

a. pCymMV-SpeI



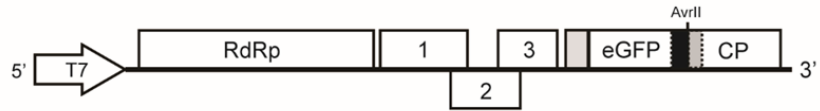
b. pCymMV-CP-SmaI



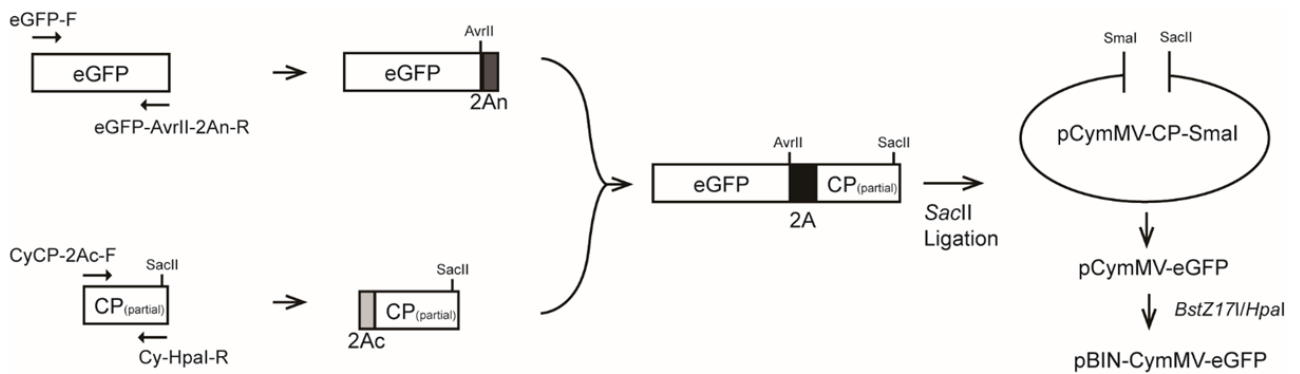
c. pCymMV-eGFP



d. pCymMV-eGFP-CP^{GP}
(pCymMV-eGFP-CP^{ES})



(B)



圖七、本研究中使用之 CymMV 感染性選殖株及其構築方式

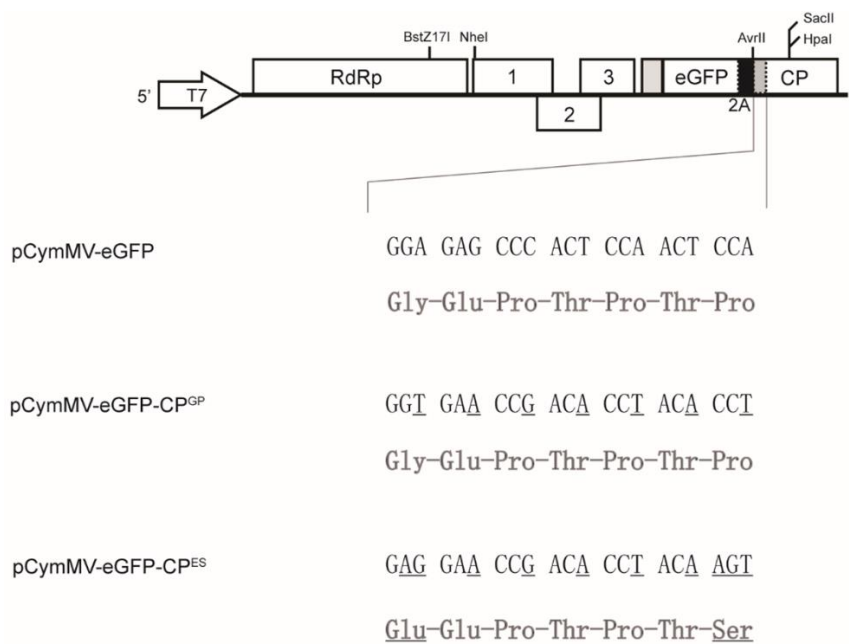
(A) 本研究中使用到由 T7 promoter 驅動之 CymMV 感染性選殖株，骨架為 pUC119 (Vieira and Messing, 1987)；(a) 修改自 (Huang, 2014)，原直線化切位為 *SmaI*，將直線化切位修改為 *SpeI*，黑色底線 -60~+22 代表 CP 之次基因體啟動子 (Lu et al., 2007)，以 CP 基因轉錄起始位的第一個 A 作為 +1。箭頭指示 *SpeI* 之截切位置，*BstZ171*、*NheI*、*HpaI*、*SacII* 及 *SpeI* 為本質體之單一切位。(b) 參考 (Lu et al., 2007) 由 pCymMV-SpeI 構築 pCymMV-CP-SmaI，斜線為 *SmaI* 之截切位置，亦為本質體之單一切位。底線標註之「C」為 CP 次基因體啟動

子之最後一個核苷酸；(c) 由 pCymMV-CP-SmaI 修改，利用 2A peptide 表現 enhanced green fluorescent protein (eGFP)。實線灰色方框為 CP 之 N 端(CPN)，共有 24 個核苷酸表現於 eGFP 之 N 端(ATGGGAGAGCCCACTCCA ACTCCC)，胺基酸序列為 MGEPTPTP，eGFP 之 C 端緊鄰 2A peptide (NFDLLKLAGDVESNPGP) (Donnelly et al., 2001)，以虛線黑色方框表示，並於 eGFP 與 2A 之間額外創造單一切位 *AvrII*；其後為 CP 之 open reading frame (ORF)，不帶原始的 ATG 序列。(d) 為避免 CPN 與 CP ORF 前端於病毒感染過程中產生重組反應，利用重組 PCR (recombinant PCR) 將 CP ORF 之 N 端的核苷酸序列進行修改(修改後序列見圖七)。修改區域以虛線灰色方框表示。(B) pCymMV-eGFP 之構築流程。2An 與 2Ac 分別為 2A 之 N 端與 C 端，個別以深灰色與淺灰色方框表示。

Fig 7. Schematic representation of CymMV infectious cDNA clones.

T7-driven CymMV infectious clones used in this study. The backbones are pUC119(Vieira and Messing, 1987); (a) The *SmaI* restriction site in the original clone, pUC119-CymMV9, for linearization, was replaced by *SpeI* to generate pCymMV-*SpeI*. The numbers below the black underline represents CP subgenomic promoter region of CymMV corresponding to the upstream and downstream CP translation start codon, respectively(Lu et al., 2007). The arrow indicates the *SpeI* restriction site. *BstZ17I*, *NheI*, *HpaI*, *SacII* and *SpeI* are unique restriction sites of pCymMV-*SpeI*. (b) According to Lu *et al.*(2007), pCymMV-CP-*SmaI* is created from pCymMV-*SpeI*. The slash indicates the *SmaI* cutting site. The underlined “C” represents the last nucleotide of the subgenomic promoter region. (c) pCymMV-eGFP is derived from pCymMV-*SmaI*. 2A peptide expression strategy was used to express enhanced GFP (eGFP). Grey-filled box indicates the N-terminus of CP (CPN). 24-nt were in-frame fused to eGFP N-terminal (ATGGGAGAGCCCACTCCA ACTCCC) and the amino acid were MGEPTPTP. The 2A peptide

(NFDLLKLAGDVESNPGP) is right after the C-terminal of eGFP(Donnelly et al., 2001), represented by black dotted box. Additional *Avr*II restriction site was created between eGFP sequences and 2A peptide. CP ORF (without natural ATG sequences) is right after the *Avr*II restriction site. (d) To avoid the recombination between CPN and the N-terminus of CP ORF, nucleotide sequences were mutated by recombinant PCR (Figure 7. shows the altered sequences). Altered region are represented in gray dotted box. (B) Cloning processes of pCymMV-eGFP. 2An and 2Ac are indicated the N-terminal and C-terminal of 2A, representing by dark grey box and light grey box.

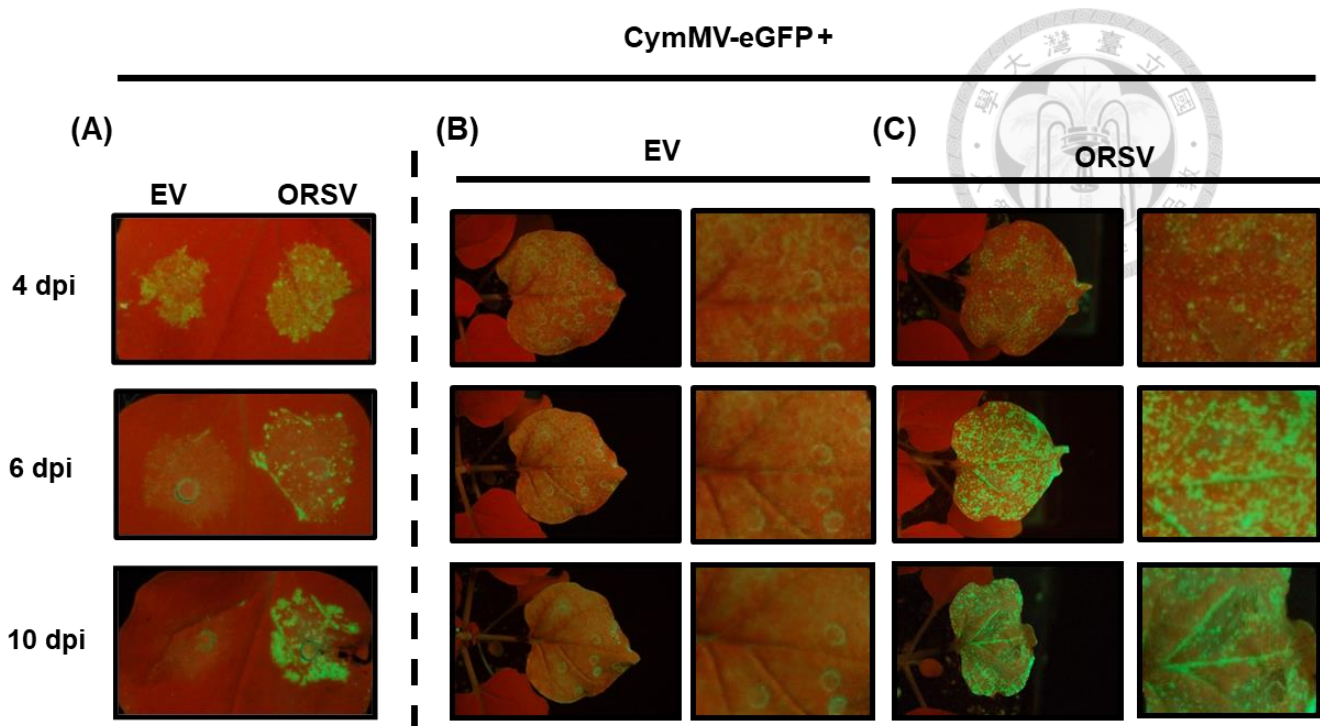


圖八、CymMV-eGFP 及其鞘蛋白 N 端突變株之胺基酸序列

以 pCymMV-eGFP 為骨架，利用重組 PCR 將 CP ORF 之 N 端的核苷酸序列進行修改，得到 pCymMV-eGFP-CP^{GP} 及 pCymMV-eGFP-CP^{ES}，分別更動 7 個和 10 個核苷酸，其中 pCymMV-eGFP-CP^{GP} 為同義突變(synonymous mutation)，胺基酸序列不變，pCymMV-eGFP-CP^{ES} 則將第二個胺基酸(第一個胺基酸為已被刪除之 methionine)由 glycine 改為 glutamic acid，第八個胺基酸由 threonine 改為 serine。底線標註更動之序列位置。

Fig 8. The amino acid sequences of CymMV-eGFP and the CP N-terminus mutation derivatives.

The N-terminus of CP was mutated by recombinant PCR with the backbone of pCymMV-eGFP, resulting pCymMV-eGFP-CP^{GP} and pCymMV-eGFP-CP^{ES}. pCymMV-eGFP-CP^{GP} altered 7 nucleotides and pCymMV-eGFP-CP^{ES} altered 10 nucleotides, respectively. No amino acids were changed in pCymMV-eGFP-CP^{GP} (synonymous mutation). On the contrary, pCymMV-eGFP-CP^{ES} 2 amino acids on the second and eighth residue of CP N-terminus (first amino acid refers to the deleted methionine) were changed. Underline indicates the altered sequences.

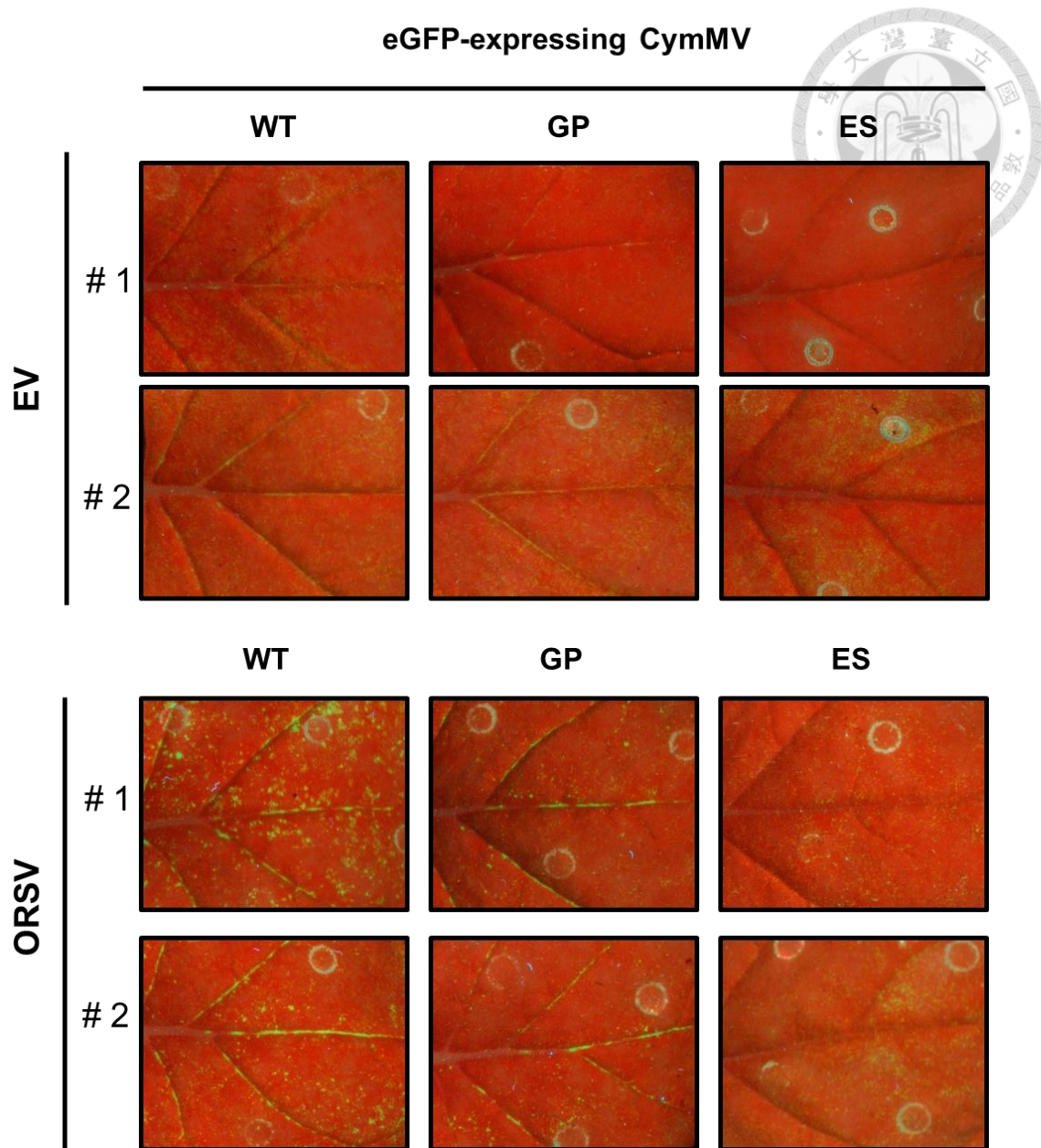


圖九、ORSV 影響 CymMV-eGFP 於圓葉菸草接種葉之螢光表現

以農桿菌接種法共表現 CymMV-eGFP 及 ORSV 於圓葉菸草，葉片在接種後 4、6 及 10 天於 UV 燈下拍照記錄。(A)為於同一葉片上比較空載體(EV)或 ORSV 與 CymMV-eGFP 共表現時，eGFP 螢光表現之情況。(B)、(C)為共表現 EV 或 ORSV 之 CymMV-eGFP 接種全葉，觀察葉面及葉脈之螢光表現。右側為左側之放大圖。

Fig 9. Fluorescence expression of CymMV-eGFP affected by co-expressed ORSV on inoculated *N. benthamiana* leaves.

N. benthamiana leaves were agro-inoculated with CymMV-eGFP and ORSV (or empty vector). Leaves were photographed at 4, 6 and 10 dpi under UV illumination. (A) Empty vector (EV) or ORSV were co-expressed with CymMV-eGFP in the same leaf. (B) and (C) The eGFP intensity and its accumulation in veins were observed on the leaves which were fully agro-infiltrated. Right panels were the zoom in image of left panels.



圖十、ORSV 對三種 CymMV 螢光表現株於圓葉菸草接種葉之螢光表現之影響

以農桿菌接種法共表現不同的 CymMV 螢光病毒株及 ORSV(或空載體)，葉片在接種 7 天於 UV 燈下拍照記錄。每種處理紀錄兩片葉片(#1 及#2)，WT 為 pBIN-CymMV-eGFP (意指其 CP 之 N 端未經過突變)；GP 為 pBIN-CymMV-eGFP-CP^{GP}；ES 為 pBIN-CymMV-eGFP-CP^{ES}。

Fig 10. Fluorescence expression of three eGFP-expressing CymMV clones affected by ORSV on inoculated *N. benthamiana* leaves.

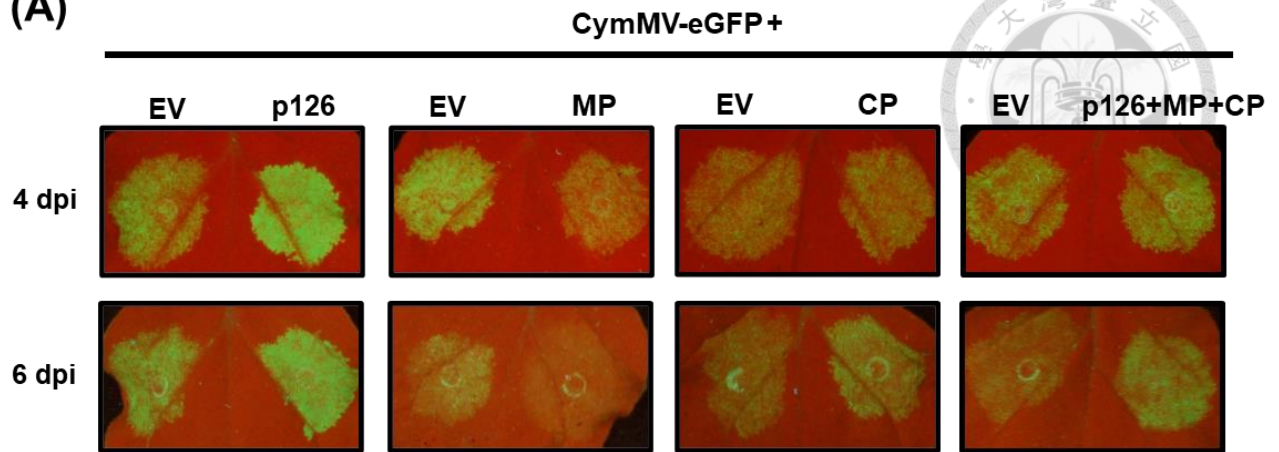


ORSV (or empty vector, EV) were agro-infiltrated along with different eGFP-expressing

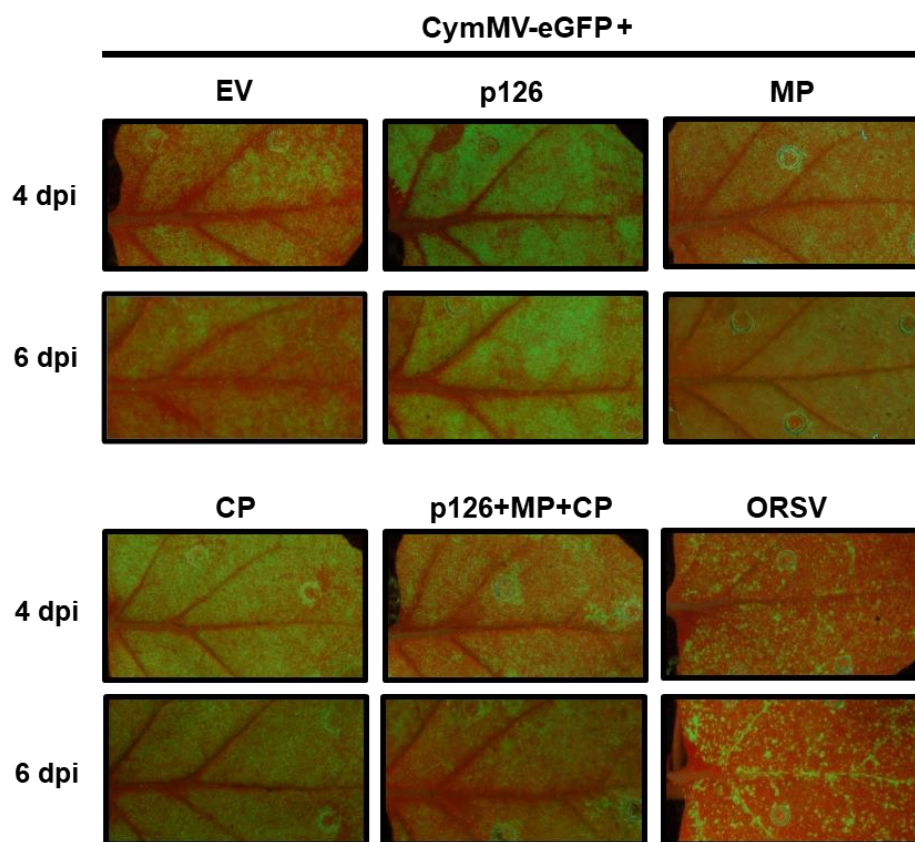
CymMV clones to *N. benthamiana*. Two leaves were photographed for each treatment at 7 dpi.

WT refers to pBIN-CymMV-eGFP; GT refers to pBIN-CymMV-eGFP-CP^{GP}; ES refers to pBIN-CymMV-eGFP-CP^{ES}.

(A)



(B)



圖十一、ORSV 不同蛋白對 CymMV-eGFP 螢光表現之影響

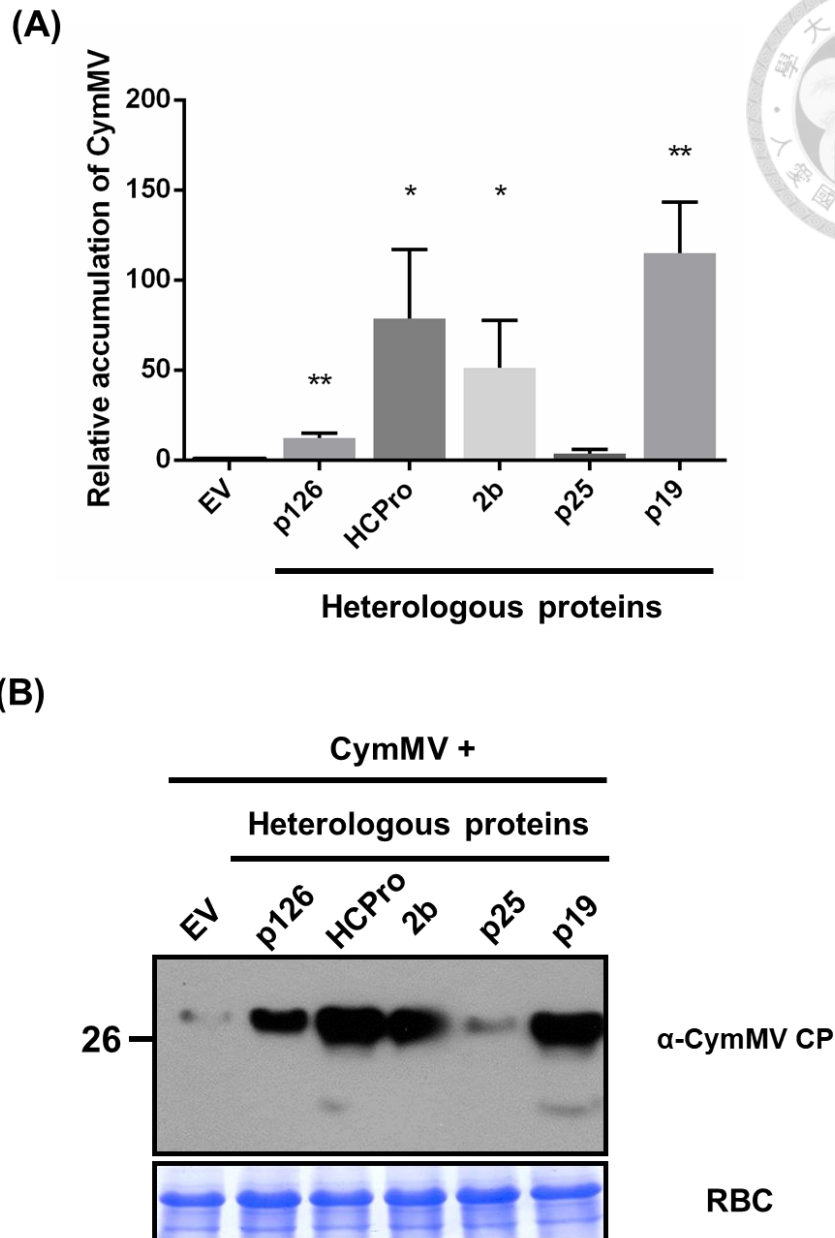
以農桿菌接種法共表現 CymMV-eGFP 及 ORSV 之 p126、MP、CP (OD_{600} 為 0.3) 或三種蛋白共同表現 (OD_{600} 為 0.2, 0.2, 0.2)，葉片於接種後第 4 天與第 6 天，於 UV 燈下拍照記錄。(A) 於同一葉片上比較空載體 (EV) 與 p126、MP、CP 或三種蛋白共同表現之 CymMV-

eGFP 螢光表現。(B)接種全葉，觀察葉面及葉脈之螢光表現。ORSV 為螢光訊號進入葉脈之正對照組。



Fig 11. Fluorescence expression of CymMV-eGFP affected by different co-expressed ORSV proteins on *N. benthamiana* leaves.

N. benthamiana leaves were agro-infiltrated with CymMV-eGFP and ORSV p126, MP, CP (OD₆₀₀ 0.3 for each expression clone), and all of them (OD₆₀₀ 0.2 for each expression clone). Leaves were photographed at 4 and 6 dpi under UV illumination. (A) Empty vector (EV) or ORSV proteins were co-expressed with CymMV-eGFP in the same leaf. (B) Images of eGFP intensity and its accumulation in veins were observed on the leaves which were fully agro-infiltrated. Co-expression of ORSV and CymMV-eGFP revealing the eGFP signal in veins as positive control.



圖十二、表現不同病毒基因靜默抑制子對 CymMV 累積量的影響

以農桿菌接種法共表現 CymMV 以及不同病毒之基因靜默抑制子：ORSV p126 (正對照

組)、*Turnip mosaic virus* HCPro、*Cucumber mosaic virus* 2b、*Potato virus X* p25 及 *Tomato*

bushy stunt virus p19，於接種後 3 天收取菸草接種葉進行分析。(A)以 RT-qPCR 偵測

CymMV 病毒 RNA 含量，使用 CymMV RdRp 專一性引子對 (qCymMV-145F/qCymMV-

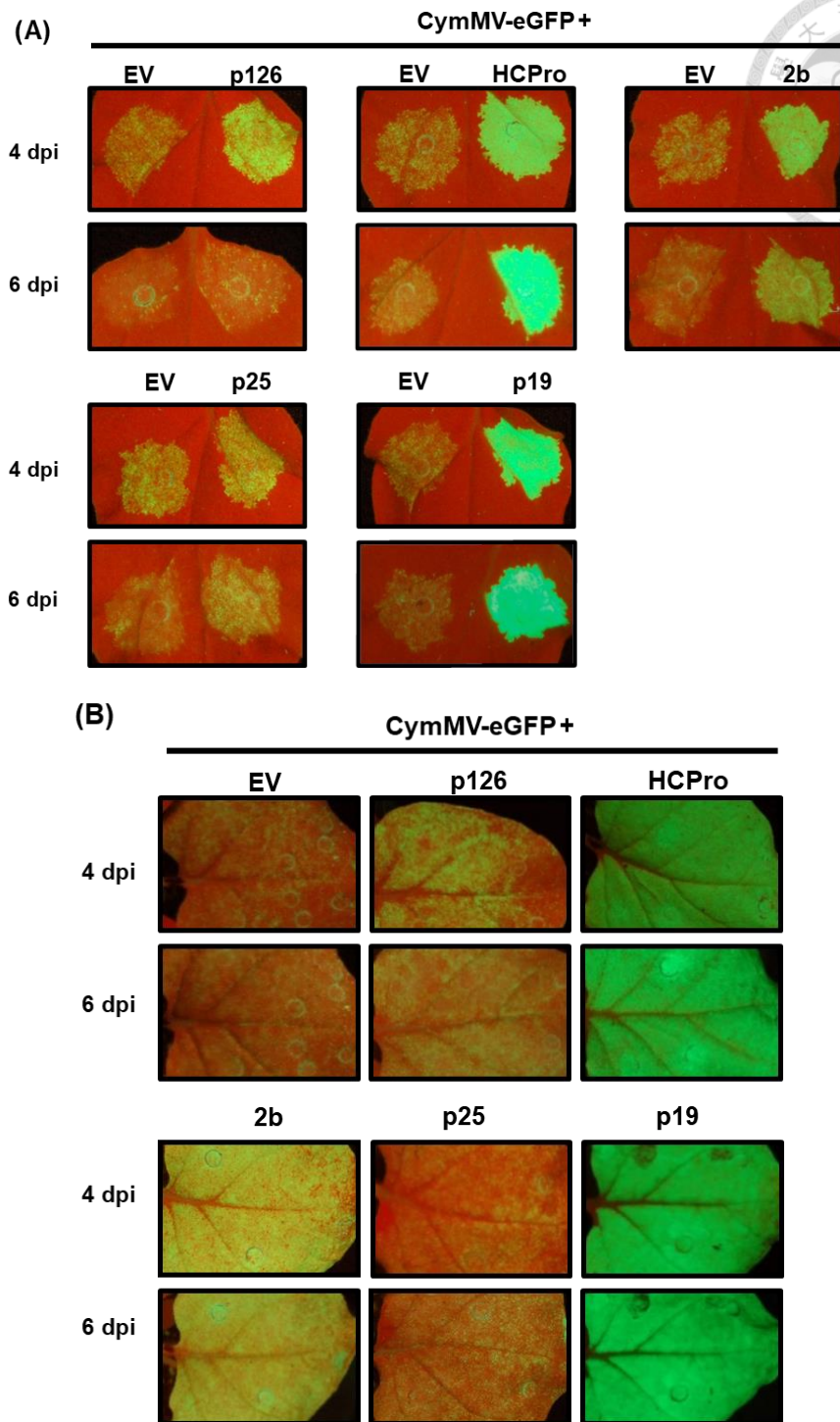
145R)，以菸草 protein phosphatase 2A 基因作為 internal control 進行標準化，將共表現空載

體(EV)之 CymMV 表現量作為基準點(1.0)。星號(*)代表該組別與 EV 組有顯著差異(雙尾；學生 *t* 檢定法，*代表 $P < 0.05$ ；**代表 $P < 0.01$)。(B)以 Western blot 分析 CymMV 鞘蛋白之累積。以 Coomassie brilliant blue G-250 對 PVDF 膜進行染色，將 rubisco (RBC)作為 loading control。



Fig 12. The effect of co-expressed different viral RNA silencing suppressors on CymMV accumulation

CymMV were agro-infiltrated along with different viral RNA silencing suppressors (RSS), including ORSV p126 (positive control), *Turnip mosaic virus* HCPro, *Cucumber mosaic virus* 2b, *Potato virus X* p25 and *Tomato bushy stunt virus* p19. Infiltrated leaves of *N. benthamiana* were harvested at 3 dpi and subjected to analysis. (A) RT-qPCR was used to quantify CymMV viral RNA accumulation. Viral RNA was amplified by CymMV-specific primers targeting RdRp gene (qCymMV-145F/qCymMV-145R). The values were normalized against tobacco protein phosphatase 2A as control gene. The level of viral RNA in EV was used as the standard (1.0). Asterisks indicate significant difference compared with EV (two-tailed Student's *t*-test, single asterisk; $P < 0.05$, double asterisk; $P < 0.01$). (B) Western blot was used to analyze the accumulation of CymMV capsid protein. PVDF was stained by Coomassie brilliant blue G-250, and rubisco (RBC) was served as loading control.



圖十三、病毒基因靜默抑制子對 CymMV-eGFP 螢光表現之影響

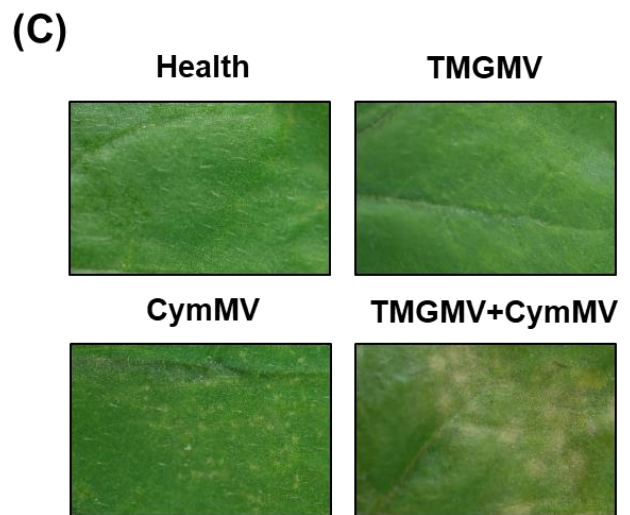
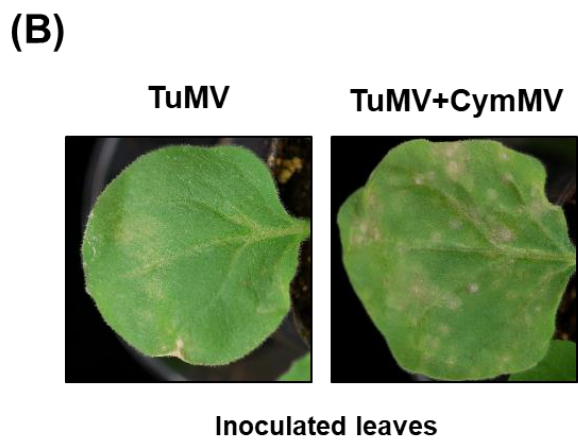
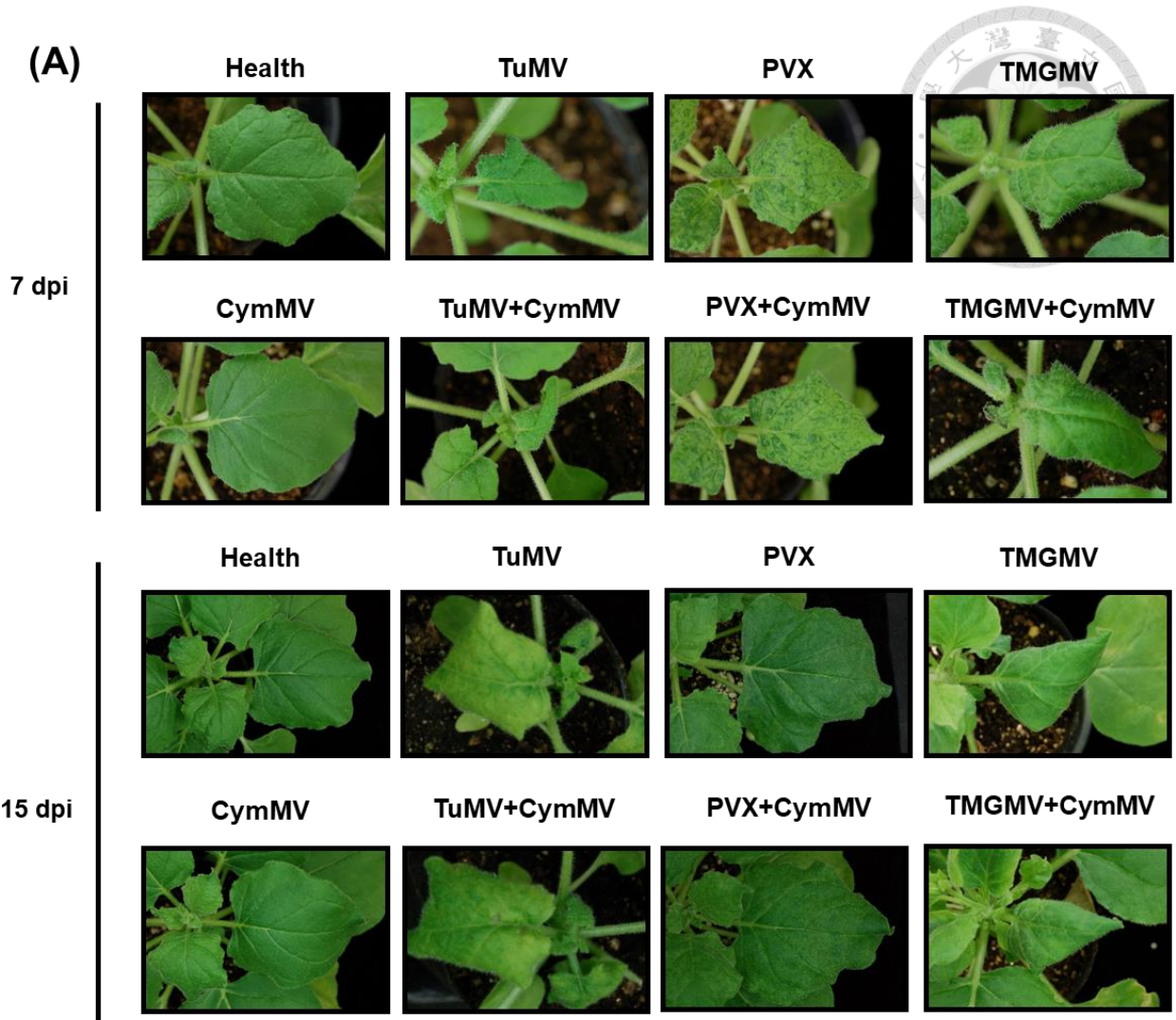
以農桿菌接種法共表現 CymMV-eGFP 及圖十一提及之病毒基因靜默抑制子，葉片於接種後第 4 天與第 6 天於 UV 燈下拍照記錄。(A)於同一葉片上比較共表現空載體(EV)與病毒

基因靜默抑制子時，CymMV-eGFP 螢光之表現量。(B)注射全葉，觀察葉面及葉脈之 CymMV-eGFP 螢光表現。



Fig 13. Fluorescence expression of CymMV-eGFP affected by different co-expressed viral RNA silencing suppressors on *N. benthamiana* leaves.

N. benthamiana leaves were agro-infiltrated with CymMV-eGFP along with different viral RSSs, mentioned in Fig. 11. Leaves were photographed at 4 and 6 dpi under UV illumination. (A) Empty vector (EV) or RSSs were co-expressed with CymMV-eGFP in the same leaf. (B) Images of eGFP intensity and its accumulation in veins were observed on the leaves which were fully agro-infiltrated.



圖十四、CymMV 與 TuMV、PVX、TMGMV 之單獨和複合感染之圓葉菸草病徵

利用罹病植物組織進行汁液接種至圓葉菸草，於植株 3 周大(第 8 片本葉展開)時，接種於第 3~5 片本葉。(A)於接種後 7 天與 15 天記錄系統葉病徵。TuMV 與 CymMV 複合接種時，於接種後 15 天可於部分植物觀察到系統葉有壞疽斑點；而 PVX 及 TMGMV 單獨感染之病徵，與其和 CymMV 複合感染之病徵無異。(B)接種後 10 天，紀錄 TuMV 單獨和複合接種之接種葉病徵。複合感染 CymMV 時，可見灰白色壞疽斑點出現，病斑隨時間擴大、癒合，最終使接種葉乾枯壞死。(C)接種後 15 天，紀錄 TMGMV 單獨和複合接種之接種葉病徵。TMGMV 複合感染 CymMV 時，出現灰白色塊斑，與單獨接種 CymMV 時的白色小斑點有明顯差異。Health 為以健康植物汁液接種之植物。

Fig 14. The symptoms of inoculated and systemic leaves induced by single and mixed infection of CymMV with TuMV, PVX or TMGMV on *N. benthamiana*.

Crude extracts of virus-infected or healthy plants were applied mechanically to 3th to 5th true leaves of eight-leaf stage *N. benthamiana* (about 3 weeks old). (A) The symptoms on systemic leaves were photographed at 7 and 15 dpi, which had no differences between PVX and PVX+CymMV, or TMGMV and TMGMV+CymMV. When TuMV co-infected with CymMV, necrotic spots appeared on systemic leaves of some doubly infected plants. (B) Symptoms on inoculated leaves of singly inoculated by TuMV or doubly inoculated by TuMV and CymMV showed distinct symptoms. When TuMV co-infected with CymMV, the grayish white necrotic spots appeared at 10 dpi and gradually became complete necrosis. (C) Symptoms on inoculated leaves of singly inoculated by TMGMV or doubly inoculated by TMGMV and CymMV were photographed at 15 dpi. Tiny white spots caused by CymMV became large grayish white blotches in TMGMV and CymMV doubly infected leaves. “Health” refers to plants inoculated with virus-free saps.