

國立臺灣大學生命科學院生態學與演化生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Ecology and Evolutionary Biology

College of Life Science


National Taiwan University

Master thesis

大岩桐病毒誘導基因靜默系統之建立

Establishing virus-induced gene silencing system in

Sinningia speciosa (Gesneriaceae)



洪子桓

Tzu-Huan Hong

指導教授：王俊能 博士

陳仁治 博士

Advisor: Chun-Neng Wang, Ph.D.

Jen-Chih Chen, Ph.D.

中華民國 99 年 10 月

October, 2010

誌謝

謹將此篇論文獻給所有幫助過我的人，支持我的人以及關心我的人。

這篇論文能夠完成，首先感謝我的共同指導教授陳仁治老師，在這兩年中不吝指導我實驗操作，給予指導與建議，老師辛苦了。感謝葉信宏老師，提供 CymMV 載體，陸祥家學長更花了很多時間指導及協助我 CymMV 相關的實驗操作，深感銘謝。感謝鄭秋萍老師很仔細的修改我的論文，並啟發我許多想法。感謝中研院詹明才老師、園藝系吳俊達老師、以及鄭石通老師提供實驗材料及指導相關操作。感謝鄭秋萍老師實驗室的劉安琪學長、林玉梅學姊，鄭石通老師實驗室的林振祥學長，林讚標老師實驗室的陳瑞宏、吳允哲及陳星宇學長，葉德銘老師實驗室的秉詩，不厭其煩的給予我建議以及幫助我解決實驗上的困難。

另外要感謝我生科系的導師陳俊宏老師，和黃玲瓏老師、陳香君老師，園藝系的楊雯如老師，以及所辦的月鈴助教和莊小姐，在這些日子不斷對我持續關心及鼓勵。生演所所學會的同學以及實驗室的夥伴們，不管是學業上或是生活上，感謝有你們的陪伴和互相幫忙。以及感謝我的家人，一直在背後默默支持我。最後感謝王俊能老師這四年半來耐心的指導，不管在學業上以及做人處事的態度，我的確都得到很多。

子桓

2010/10/18

中文摘要

本研究目的為在大岩桐建立可用之病毒誘導基因靜默(VIGS)系統。大岩桐為研究花部對稱性發育機制的良好材料，野生的大岩桐族群花部多為兩側對稱，但栽培種的大岩桐花部卻為輻射對稱，此對稱性之轉變可能是人為馴化過程中所產生的單一基因突變所造成，因此我們希望在大岩桐建立近年來發展出能高效率研究基因功能之 VIGS 系統以研究花對稱性，同時可作為其他近緣植物建立 VIGS 系統之參考。本研究挑選兩種可感染分生組織的 VIGS 病毒系統：*Tobacco rattle virus* (TRV)及 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)嘗試在大岩桐靜默 *phytoene desaturase* (*PDS*)基因。結果發現 TRV 雖可系統性感染大岩桐，但用攜帶大岩桐 *PDS* 的 TRV 接種的大岩桐 *PDS* 表現量並無顯著的下降。而用攜帶大岩桐 *PDS* 的 CymMV 接種的大岩桐，有些植株的 *PDS* 表現量有顯著的下降，顯示應有引發 *PDS* 靜默，但植株葉片並無出現 *PDS* 表現量下降應有的白化現象。本研究亦測試農桿菌接種，欲提高 VIGS 之效率，但結果顯示農桿菌對大岩桐的感染效率並不佳，因而也無法有效將病毒載體帶入植物引發 VIGS。綜合本研究結果，TRV 在大岩桐尚無法引發 VIGS，推測是由於 TRV 在大岩桐無法累積足夠的病毒量引發強烈的 VIGS。除了繼續改良接種的條件外，利用原本即可感染大岩桐的病毒或利用馴化得到感染力高的病毒 clone 重新建立 VIGS 載體應為未來可以考慮的方向。而 CymMV 雖似乎有成功引發靜默的例子但性狀並未如預期改變。為證實 CymMV 可有效在大岩桐引發基因靜默並造成性狀改變，或應測試更多的報導基因。

關鍵字：大岩桐、病毒誘導基因靜默、*Tobacco rattle virus*、*Cymbidium mosaic virus*、*phytoene desaturase*、農桿菌接種

Abstract

This study aims to build a virus-induced gene silencing (VIGS) system in *Sinningia speciosa*. *Sinningia speciosa*, Gesneriaceae, is an ornamental plant and became an emerging model for studying flower development. In wild, flowers of *Sinningia speciosa* are zygomorphic, but many of their domestic counterparts are actinomorphy. The zygomorphic wild type and actinomorphic peloria provide us an excellent opportunity to compare their flower development and explore functions of candidate genes in floral symmetric regulation. VIGS is a powerful tool for studying gene functions. We chose two viral systems: *Tobacco rattle virus* (TRV) and *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) to test their silencing ability on *phytoene desaturase* (*PDS*) in *S. speciosa*. Our results showed that *S. speciosa* could be systemically infected by TRV, but no down-regulation of *PDS* observed; however, CymMV caused down-regulation of *PDS* in some *S. speciosa* individuals though they did not display expected photo-bleaching. *Agrobacterium* inoculation was also tested. However, *Agrobacterium* showed poor infectivity to *S. speciosa* and *Agrobacterium* inoculation failed to help increase the VIGS efficiency. Concluding our results, the failure to induce VIGS by TRV in *S. speciosa* may be due to the poor infectivity. Besides optimizing the inoculation conditions, constructing new VIGS vectors from viruses that naturally occurring in *S. speciosa* or virus clones with more infectivity by domestication is

preferred in the future. In addition, *PDS* of *S. speciosa* seems to be successfully down-regulated by CymMV, but the phenotype was not changed. To better confirm that gene silencing can be efficiently induced by CymMV in *S. speciosa*, more reporter genes should be tested.

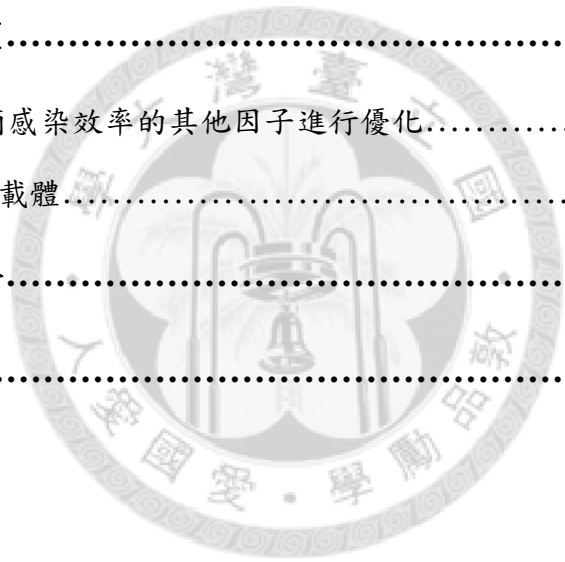
Keywords: *Sinningia speciosa*, virus-induced gene silencing, *Tobacco rattle virus*, *Cymbidium mosaic virus*, *phytoene desaturase*, *Agrobacterium* inoculation



目錄

| | |
|---|-----------|
| 誌謝..... | i |
| 中文摘要..... | ii |
| 英文摘要..... | iii |
| 目錄..... | v |
| 圖目錄..... | vii |
| 表目錄..... | ix |
| 第一章、前言..... | 1 |
| 苦苣苔科簡介..... | 1 |
| 大岩桐簡介..... | 1 |
| 病毒誘導基因靜默(VIGS)..... | 3 |
| 病毒載體系統..... | 5 |
| VIGS 報導基因..... | 7 |
| 農桿菌媒介病毒接種..... | 7 |
| 研究目的..... | 9 |
| 第二章、材料與方法..... | 10 |
| 一、植物材料及栽培環境..... | 10 |
| 二、一般分生操作..... | 12 |
| 三、病毒載體及其衍生載體建構..... | 13 |
| 四、病毒感染力分析..... | 17 |
| 五、農桿菌暫時性表現分析及農桿菌接種..... | 18 |
| 六、fluridone 離層酸抑制劑 (ABA inhibitor)處理..... | 21 |
| 第三章、結果..... | 22 |
| 一、病毒感染力分析..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 二、PDS 靜默..... | 31 |
| 三、農桿菌暫時性表現分析..... | 44 |
| 四、農桿菌媒介 VIGS..... | 51 |
| 第四章、討論..... | 53 |
| 大岩桐的系統葉可偵測到 TRV，但並未引發 VIGS..... | 53 |
| CymMV 有可能成功在大岩桐引發 VIGS，但沒有產生白化性狀..... | 54 |
| 若欲用 TRV 和 CymMV 系統研究大岩桐花部基因功能需考慮花梗接種..... | 56 |
| 農桿菌接種並非適合大岩桐 VIGS 系統的接種方式..... | 56 |
| 第五章、未來展望..... | 59 |
| 對影響病毒及農桿菌感染效率的其他因子進行優化..... | 59 |
| 建立新的 VIGS 病毒載體..... | 61 |
| 第六章、參考資料..... | 63 |
| 第七章、附錄..... | 74 |



圖目錄

| | |
|---|----|
| 圖一、不同花對稱形式的大岩桐..... | 2 |
| 圖二、本研究所使用的各種品系大岩桐..... | 11 |
| 圖三、TRV 表現載體 pTRV1 及 pTRV2 的基因圖..... | 14 |
| 圖四、CymMV 表現載體 pCymMV 的基因圖..... | 16 |
| 圖五、CymMV 表現載體 pCymMV 的環狀結構圖..... | 16 |
| 圖六、TMV 表現載體的基因圖..... | 16 |
| 圖七、用帶 TRV 的煙草組織液接種”AVANTI”大岩桐及煙草，接種經過 19 天後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果..... | 23 |
| 圖八、被 TRV 接種 19 天後可用 RT-PCR 在系統葉偵測到 TRV 序列的”AVANTI”大岩桐及煙草..... | 23 |
| 圖九、用帶 CymMV 的蘭花組織液接種”AVANTI”大岩桐及煙草，接種經過兩週後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果..... | 25 |
| 圖十、用胞外轉錄出的 CymMV RNA 接種”AVANTI”大岩桐及煙草，接種經過兩週後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果..... | 26 |
| 圖十一、用胞外轉錄出的 CymMV RNA 接種”AVANTI”大岩桐及煙草，接種經過 40 天後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果..... | 26 |
| 圖十二、用帶 CymMV 的蘭花汁液接種不同品系的大岩桐及煙草，接種經過兩週後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 的分析結果..... | 28 |
| 圖十三、感染 CymMV 的煙草之病徵..... | 28 |
| 圖十四、接種 pTMV-GFP 之”AVANTI”大岩桐及煙草性狀..... | 29 |
| 圖十五、接種 TMV-GFP 之”AVANTI”大岩桐及煙草照射螢光的結果..... | 30 |
| 圖十六、用 TMV-GFP 接種的”AVANTI”大岩桐及煙草，接種經過兩週後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果..... | 30 |
| 圖十七、pTRV2 衍生載體的結構圖..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 圖十八、"AVANTI"大岩桐(Ss)及煙草(Nb) <i>PDS</i> ₈₄₃ 的全序列..... | 33 |
| 圖十九、用 TRV <i>PDS</i> 接種之煙草的靜默性狀..... | 35 |
| 圖二十、"AVANTI"大岩桐經 fluridone 處理後第九天(9dpi)及第十四天(14dpi)之性 狀轉變..... | 36 |
| 圖二十一、被 TRV <i>SsPDS</i> ₈₄₃ 接種 18 天後的植株性狀..... | 37 |
| 圖二十二、被TRV <i>SsPDS</i> ₈₄₃ 接種18天後的"AVANTI"大岩桐及煙草取系統葉抽RNA 做RT-PCR分析感染結果..... | 37 |
| 圖二十三、 <i>PDS</i> 基因與引子位置示意圖..... | 38 |
| 圖二十四、被TRV <i>NbPDS</i> ₂₇₉ 及TRV <i>SsPDS</i> ₈₄₃ 接種18天後的煙草取系統葉抽RNA做 RT-PCR分析 <i>PDS</i> 靜默的結果..... | 39 |
| 圖二十五、被TRV <i>SsPDS</i> ₈₄₃ 接種18天後的"AVANTI"大岩桐取系統葉抽RNA做 RT-PCR分析 <i>PDS</i> 靜默的結果..... | 39 |
| 圖二十六、用TRV <i>SsPDS</i> ₈₄₃ 接種的"AVANTI"大岩桐，接種經過40天後取系統葉抽 RNA做RT-PCR分析感染的結果..... | 40 |
| 圖二十七、pCymMV- <i>SsPDS</i> ₈₄₃ 的結構圖..... | 41 |
| 圖二十八、用限制酶KpnI確認建構好的CymMV衍生載體..... | 41 |
| 圖二十九、被CymMV <i>SsPDS</i> ₈₄₃ 接種15天後的"AVANTI"大岩桐及煙草取系統葉抽 RNA做RT-PCR分析感染及 <i>PDS</i> 靜默的結果..... | 43 |
| 圖三十、被攜帶pCAMBIA1301的農桿菌接種的"Tigrina"大岩桐葉片，經染色後有 GUS訊號之葉片樣品..... | 45 |
| 圖三十一、煙草葉片GUS染色結果..... | 48 |
| 圖三十二、被 GV2260 TRV <i>SsPDS</i> ₈₄₃ 接種 17 天後的植株性狀..... | 52 |
| 圖三十三、用 RT-PCR 分析被 GV2260 TRV <i>SsPDS</i> ₈₄₃ 接種的大岩桐及煙草被 TRV 感染的情形及 <i>PDS</i> 基因靜默的程度..... | 52 |
| 圖三十四、被加壓注射農桿菌後接種葉萎凋的大岩桐..... | 60 |

表目錄

| | |
|---|----|
| 表一、被攜帶 pCAMBIA1301 的農桿菌接種的”Tigrina”大岩桐葉片，經染色後有 GUS 訊號之葉片樣品分級之等級標準..... | 44 |
| 表二、固定 acetosyringone (AS)濃度，對四種農桿菌品系進行 GUS assay 試驗之結果..... | 48 |
| 表三、固定農桿菌品系，對五個 acetosyringone 濃度等級進行 GUS assay 試驗之結果..... | 50 |
| 表四、將表三之結果，加入測試不同農桿菌品系試驗的資料，分析不同 acetosyringone 濃度等級對 GUS assay 結果之影響..... | 50 |



第一章、前言

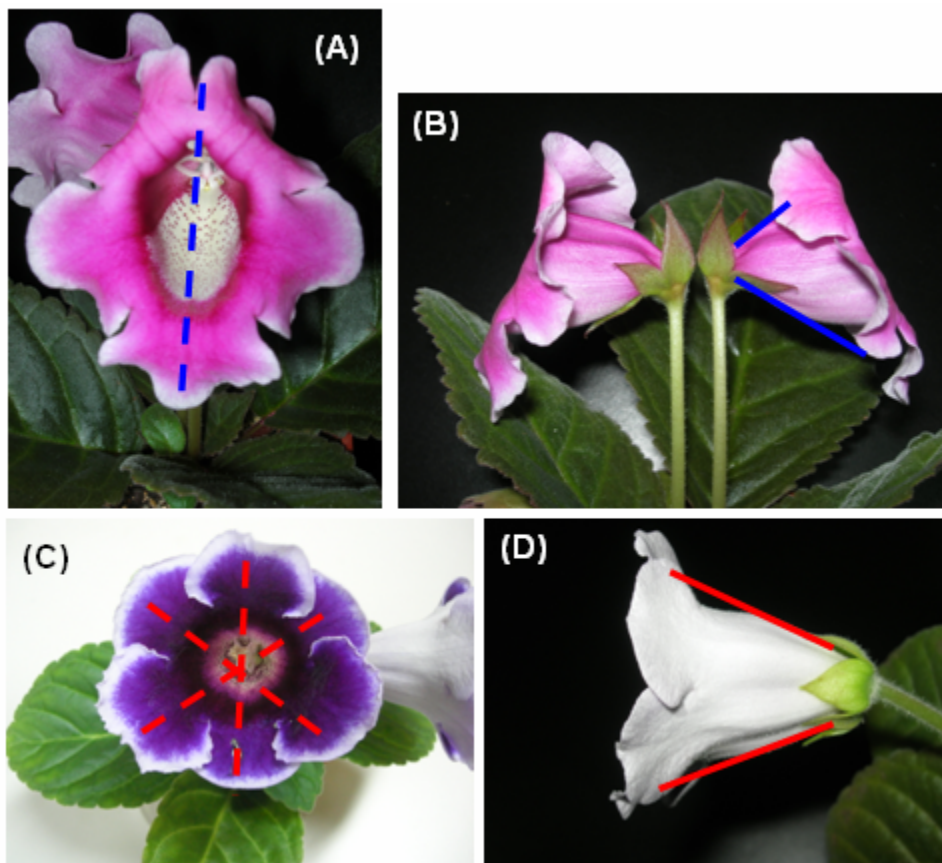
苦苣苔科簡介

苦苣苔科為真雙子葉植物菊類群唇形目中的大科，包括 150 餘屬 3200 餘種，廣泛分布於熱帶及亞熱帶甚至溫帶地區(Weber and Skog, 2007; Moller et al., 2009)。此科植物因其多變的花型及花色，為重要的園藝花卉作物來源，如大岩桐、非洲堇、堇蘭、喜蔭花等。苦苣苔科植物在被子植物中具有許多特別的發育現象，如非洲堇及大岩桐花部對稱性的反轉(Kuo, 2008; Chang, 2009a; Hsu, 2009)、俄氏草的花序反轉現象(Wang and Cronk, 2003; Chang, 2009b)、舊世界苦苣苔的子葉不等大現象(Nishii and Nagata, 2007)，而這些現象對植物演化發育的研究者來說，是有趣的研究主題。

大岩桐簡介

大岩桐(*Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern)為苦苣苔科常見的園藝花卉之一。大岩桐原生於中南美洲的熱帶高原，其生長環境偏好 22~30 °C，潮濕，通風良好，半日照的濕地岩石上(Chautems et al., 2000)。大岩桐於 1815 年首先在巴西採集到並隨即被帶回歐洲栽培。最初分類學家將其歸類到 *Gloxinia* 屬，並命名為 *Gloxinia speciosa*。到了 1825 年，大岩桐才被重新分類並訂正為現在的學名，也因而有一些早期的文獻常常會把大岩桐叫做 *Gloxinia* (Citerne and Cronk, 1999)。大岩桐在人為選種的過程中，發生了花部對稱性的反轉現象：野生的大岩桐其雄蕊排列在雌蕊的背側位置，蜜標只出現在腹側，且花冠筒近軸面與遠軸面的長度有顯著差異(Hsu et al., 2009)，整體花部形態呈現兩側對稱，而兩側對稱的花對稱性形式也是苦苣苔科的祖型特徵(Citerne et al., 2000)。但花市上所見的園藝大岩桐卻呈現雄蕊成環狀排列在雌蕊外，蜜標平均分散在花冠筒內側，而花冠筒的近軸面與遠軸面長度無差異，整體花部為輻射對稱的形式(圖一)。現今具有輻射對稱花的大岩桐皆

是同一株突變株的後代(Citerne and Cronk, 1999)，花對稱性改變的事件只發生一次。另前人研究曾將兩側對稱花的大岩桐品系與輻射對稱花的品系進行雜交，再將其自交後得到的 F2 子代，其花部形態為兩側對稱跟輻射對稱的個體比例為 3:1，這顯示大岩桐的花部對稱性反轉現象很可能僅為一個基因座的突變造成(Hsu et al., 2009)。這使我們可針對少數目標基因進行分析，因此大岩桐提供了一個研究植物花對稱性發育基因功能的良好材料。



圖一、不同花對稱形式的大岩桐。A、B 為野生種及園藝種大岩桐雜交的 F2 世代，花內部雄雌蕊及蜜標的排列方式呈兩側對稱，花冠筒近軸面及背軸面長度不等。C、D 為園藝種大岩桐，其花瓣蜜標及雄雌蕊排列皆呈輻射對稱，花冠筒近軸面及背軸面長度接近相等。

病毒誘導基因靜默(VIGS)

病毒誘導基因靜默(virus-induced gene silencing, VIGS)是近年來發展出之研究基因功能的策略。其原理為基於植物對抗病毒感染之轉錄後基因靜默(PTGS, post transcriptional gene silencing)機制(Burch-Smith et al., 2004)。轉錄後基因靜默是指基因轉錄出 mRNA 後，mRNA 被降解或調節而造成基因不表現的現象。VIGS 的現象最早被發現在植株抗病的研究：原本容易被某種病毒感染的植物，在先感染另一種類似病毒後，反而具有抵抗病毒的能力(McKinney, 1929)，但不知道是什麼機制使得植物產生抗病能力。1990 年，Jorgensen 等人將合成花青素的基因 *chalcone synthase (CHS)* 轉殖到矮牽牛上，想得到色彩更鮮艷的花朵，然而不僅沒有得到更鮮艷的花，反而有 42 % 的植株花瓣出現部份白化或全部白化的現象(Napoli et al., 1990)，且植株 *CHS* 的 mRNA 表現量大量減少，顯示發生了基因靜默，這個現象又被稱為共抑制(co-suppression)。後來陸續發現有其他共抑制及植物抗病的例子(Vanderkrol et al., 1990; Lindbo et al., 1993)，這些現象可能皆源自同一個機制，都是由於外來載體具有跟植物類似的基因序列所引起，且接種載體後此基因 mRNA 的表現量便大量減少(Ratcliff et al., 1997)。1999 年 David Baulcombe 在誘發 PTGS 產生的煙草上找到一段可能與 PTGS 相關的 25 bp 小片段 RNA (Hamilton and Baulcombe, 1999)。同一時期動物學界也在秀麗線蟲上發現相似的小片段 RNA，其也會引發線蟲內 mRNA 降解的現象，並命名為 RNA 干擾(RNAi) (Fire et al., 1998)，兩者的情況相當類似，顯示 PTGS 應是 RNAi 機制造成的其中一種現象(Voinnet et al., 2000)。1995 年 Kumagai 利用病毒攜帶基因片段欲將基因過度表現，基因卻未如預期的過量表現，表現量反而下降(Kumagai et al., 1995)，認為可能是產生 PTGS，而這種由病毒引發的 PTGS 現象便被稱為 VIGS (Ruiz et al., 1998)。

當病毒侵入植物後，病毒的基因體開始複製形成雙股的 RNA，雙股 RNA 在植物體內會被一種像 Dicer 的酵素所辨認並且將其切斷形成小片段的雙股 RNA，這些小片段的雙股 RNA 解離成單股後的形式，便稱為 small interfering RNA

(siRNA)。siRNA 會跟酵素 Argonaute (AGO) 結合形成 RNA induced silencing complex (RISC)，RISC 會在細胞內尋找與其互補的 RNA 片段並黏合上去形成部份雙股的 RNA，並將此一互補的 RNA 進行截切或是抑制其轉譯作用。此外以 RNA 為模板之 RNA dependent RNA polymerase (RdRP) 會將其補成完整的雙股 RNA，接著又再度被 Dicer 辨認並切斷成新的 siRNA (secondary siRNA)，以加強基因靜默之效果使得病毒的基因無法表現(Mlotshwa et al., 2002; Becker and Lange, 2010)。PTGS 在發生後也會產生靜默訊號(silencing signal)散播到全株，使沒有被病毒入侵的部份也可能發生基因靜默的現象阻止病毒擴散(Kalantidis et al., 2008; Becker and Lange, 2010)。在用 VIGS 進行基因功能分析的策略上：先將想要靜默的基因同源序列接到病毒載體中，當病毒載體被接種進植物體內並感染植物時，便會誘導植物啟動 PTGS 機制而產生 siRNA。由於共抑制現象，這些 siRNA 除了會降解接在病毒上目標基因所產生的 mRNA 外，同時也會降解植物本身基因所產生的 mRNA，使此基因無法表現。當目標基因被靜默時，藉由比較此處理株跟正常植株性狀的差異，便可推測此目標基因之功能。

相較於傳統研究基因功能的 T-DNA 插入或化學方式產生突變株等方法，VIGS 的花費較少且操作上較為方便(Burch-Smith et al., 2004)。其最大的突破是選用病毒作為載體，由於病毒和靜默訊號皆能在植物體系統性擴散(Mlotshwa et al., 2002)，因此除了接種葉之外的其他組織也可發現基因被靜默的現象。這個特性可讓我們直接在成株上抑制基因表現並快速觀察到結果，而不需耗費時間在繼代培養植物以及繁複的組織培養操作(Chen et al., 2004)。這使得 VIGS 除了在進行大規模的基因功能研究上比起轉殖具有更多的便利性外(Baulcombe, 1999; Lu et al., 2003a)，對許多非模式植物或生長週期長的植物如蘭花來說，可大幅縮短研究的時間以及免除轉殖時 regeneration 的困難(Liu et al., 2004; Lu et al., 2007; Wege et al., 2007)。VIGS 在基因功能研究的應用上也具有較多的彈性，例如如果研究的目標是一個基因家族，轉殖最多只能得到其中一個拷貝突變的突變株，如果這個基因家族拷貝

間具有功能 redundancy 的情形，便無法看到性狀的改變。但 VIGS 可選擇靜默整個基因家族，也可只靜默整個基因家族中的某特定拷貝，如此可克服 redundancy 的問題，且可針對特定拷貝做功能分析(Burch-Smith et al., 2004; Wang et al., 2006)。由於 VIGS 是在植株長成成體之後才作用，因此也可研究一些會參與胚發育的基因，若用傳統產生突變株的方法，一旦將這些基因突變掉，植株將會無法生長而不能觀察性狀(Lu et al., 2003b)。除此之外，有許多植物並非是農桿菌的天然宿主，而這會造成農桿菌轉殖的成功率過低。相對而言，VIGS 可選擇能感染該植物的病毒種類建立載體，便可利用病毒在植物體內的大量複製，產生強烈的靜默效果而造成顯著的性狀改變，使成功率提高。

目前已成功應用 VIGS 的植物包括阿拉伯芥(Burch-Smith et al., 2006; Cai et al., 2006)、煙草(Baulcombe, 1999)、番茄(Liu et al., 2002a)、大豆(Nagamatsu et al., 2007)、矮牽牛(Chen et al., 2004)、大麥(Holzberg et al., 2002)等模式植物，及蘭花(Lu et al., 2007)、罌粟(Wege et al., 2007)、耬斗菜(Gould and Kramer, 2007)等非模式植物，但這些植物仍集中在少數科別(Becker and Lange, 2010)。大岩桐所屬的唇形目為目前花部發育基因研究的重要材料(Endress, 1999)，然而在 2009 年前沒有任何唇形目物種具有 VIGS 系統。2010 年唇形目中的金魚草成功應用了 TRV 的 VIGS 系統(Preston and Hileman, 2010)，但金魚草跟大岩桐的親緣關係仍相距很遠，用金魚草的模式來推估大岩桐花朵的發育模式有所困難。因此我們仍需在在大岩桐建立 VIGS 系統以研究大岩桐之花部對稱性基因功能。

病毒載體系統

本研究選用兩種有 VIGS 載體的病毒：*Tobacco rattle virus* (TRV)及 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)對大岩桐進行測試。

TRV 屬於 *Tobamovirus* 屬，為 ssRNA(+)的 bipartite 病毒。TRV 的天然宿主範圍極廣，可感染多種雙子葉植物(Brunt et al., 1996)。除此之外它在作為 VIGS 載體

的條件上具有病徵輕微、可感染分生組織等優點(Burch-Smith et al., 2004; Godge et al., 2008)，因此 TRV 為目前被應用最為廣泛的 VIGS 系統，成功應用的例子包括番茄、阿拉伯芥、煙草、矮牽牛、罌粟、耬斗菜、金魚草等。TRV 在 2001 年建立了第一個 VIGS 載體，並成功在煙草上引發 VIGS (Ratcliff et al., 2001)。2002 年 Dinesh-Kumar 團隊從不同的病毒 clone 建立了更高效率的 TRV 載體(Liu et al., 2002b)，為目前大部份 TRV VIGS 研究所使用，亦為本研究所使用的載體系統。TRV 系統包括 pTRV1 及 pTRV2 兩個部份，pTRV1 上帶有病毒複製 RNA 所需的 RNA dependent RNA polymerase (RdRP)，以及跟病毒系統性感染有關的 movement protein (MP)的序列；pTRV2 上有病毒的 coat protein (CP)，以及可插入外加序列的 multiple cloning site (Liu et al., 2002b)。在前人研究中，TRV 疑似可感染同為苦苣苔科的非洲堇(Kuo, 2008)，可能也可以感染大岩桐，因此本研究將使用 TRV 系統進行測試。

CymMV 屬於 *Potexvirus* 屬的病毒，為 ssRNA(+)的 monopartite 病毒。其天然宿主主要為蘭科植物，亦可感染一些雙子葉植物(Brunt et al., 1996)。CymMV 的 3'UTR 有 poly A，5'UTR 有 methyl G cap (Wong et al., 1997)。2007 年陸祥家等人首先建構出 CymMV 的 VIGS 載體，並成功應用在蝴蝶蘭上(Lu et al., 2007)，近幾年進一步建構出農桿菌媒介的載體，使應用性更廣。在前人研究中，CymMV 也發現似乎可感染同為苦苣苔科的非洲堇(Kuo, 2008)，因此本研究也將使用 CymMV 系統測試。

除此之外，*Tobacco mosaic virus* (TMV)也是一常見的 VIGS 病毒系統。TMV 在一些文獻中被認為可以感染大岩桐(Zettler and Nagel, 1983)，雖然 TMV 無法感染分生組織(Ratcliff et al., 2001; Chen et al., 2004)，可能無法應用在花不對稱相關基因的功能研究，但或許可利用在其他生理機制的研究上，因此我們也會測試 TMV 對大岩桐的感染力。

VIGS 報導基因

本研究我們選用 *phytoene desaturase* (*PDS*)作為 VIGS 的報導基因。*PDS* 靜默為最常被用來作為 VIGS 成功與否的標記(Burch-Smith et al., 2006; Gould and Kramer, 2007)，其為植物合成胡蘿蔔素必需的基因(Demmigadams and Adams, 1992)。如果 *PDS* 被靜默，胡蘿蔔素無法合成，則葉綠素因為缺乏保護色素便容易被光破壞，植物的綠色組織便會出現白化現象(Kumagai et al., 1995; Gould and Kramer, 2007)，而這便成為一個可見的明顯標記。

由於之前沒有任何大岩桐 *PDS* 突變的性狀資料發表，大岩桐的 *PDS* 靜默會出現什麼性狀改變也仍然未知，因此我們用離層酸抑制劑(ABA inhibitor) fluridone 處理大岩桐嘗試模擬大岩桐 *PDS* 靜默可能的性狀。fluridone 會抑制離層酸的合成，而胡蘿蔔素為合成離層酸的前驅物。fluridone 抑制離層酸合成的途徑是在合成胡蘿蔔素的上游，因此會把胡蘿蔔素一起抑制掉(Bartels and Watson, 1978)。藉由 fluridone 抑制大岩桐胡蘿蔔素的合成，我們便可觀察性狀的改變，以作為 *PDS* 靜默可能之性狀對照。

農桿菌媒介病毒接種

農桿菌媒介病毒接種為結合農桿菌對雙子葉植物的高感染率及 VIGS 便利性的應用。由於農桿菌普遍能感染大多數的雙子葉植物(Hansen et al., 1994)，且以農桿菌介導的方法也較容易操作，可省略胞外轉錄的麻煩(Lu et al., 2003a; Burch-Smith et al., 2004)，因此農桿菌接種遂成為 VIGS 中病毒接種最常用的方式(Becker and Lange, 2010)。

為了得到農桿菌感染大岩桐的最佳條件，在本研究中我們使用農桿菌暫時性表現分析(*Agrobacterium* transient expression analysis)，測試在何種條件下有最好的農桿菌感染效果。農桿菌暫時性表達分析為將帶有特定基因載體的農桿菌接種到植物組織中，再偵測這些基因的表現。本研究將操作 GUS assay，藉由計算

β -glucuronidase(*GUS*)基因表現的機率以得知農桿菌成功感染植株的機率，從而得到農桿菌感染大岩桐的最佳條件。*GUS*基因的產物會將化合物X-Gluc分解而產生藍色的化合物，因此可藉由觀察藍色沉積來判斷農桿菌是否成功轉殖植物(Jefferson et al., 1987)。分析中主要選擇兩個參考自前人研究中被認為顯著影響農桿菌感染成功率的因子：

一、農桿菌菌種。不同的農桿菌具有不同的染色體遺傳背景，也可能帶有不同的Ti plasmid，這些在染色體及Ti plasmid上的基因表現很可能會影響不同種農桿菌對宿主的感染能力，也因此會影響農桿菌暫時性表現或是農桿菌介導VIGS的效率(Kushikawa et al., 2001; Cai et al., 2006; Bhaskar et al., 2009)。

二、acetosyringone 的濃度。在自然環境下，農桿菌主要趁著植物受傷時感染植物。當植物受傷時會分泌出一些酚類次級代謝物，如 acetosyringone (Hansen et al., 1994)，這些化合物會促進農桿菌 Ti plasmid 上致病基因 *vir* 的表達，使農桿菌上的 T-DNA 更易轉移到植物上(Bolton et al., 1986)。因此，acetosyringone 的濃度便成為一個可能影響轉殖率的因子。之前已有研究支持 acetosyringone 的濃度對農桿菌轉殖成功率有顯著的影響(Wang et al., 2006)，且在不同酸鹼值下 acetosyringone 也會造成不同的效果(Godwin et al., 1991)。大部份農桿菌媒介 VIGS 或農桿菌暫時性表現所用的 acetosyringone 濃度多為 100 或 200 μM ，最高有測試到 500 μM 以上(Kushigawa et al., 2002)，也有例子是不加反而效率比較好的(Rao and Rao, 2007)。在本研究中的 acetosyringone 濃度最高等級到 800 μM ，每 200 μM 為一等級來測試農桿菌接種的效率。

考量到材料及時間限制，因此實驗設計假設這兩個因子之間沒有交感作用，固定一個條件，只針對欲測驗因子的不同等級作處理。染色完成後觀察葉片有無 *GUS* 訊號，依此計算成功率。除此之外，*GUS* 訊號在每片葉子上的表現面積及訊號強弱皆可能不同，由於表現面積跟感染的細胞數相關，訊號強弱也跟 T-DNA 不能在細胞裡正常表現相關，因此本研究除了計算成功率之外，也將 *GUS* 訊號依

表現面積及表現部位分成數個等級，藉以輔助判斷真正農桿菌媒介的效率。在測試完並優化出最佳的條件之後，以此條件進一步試驗農桿菌介導的 VIGS。

研究目的

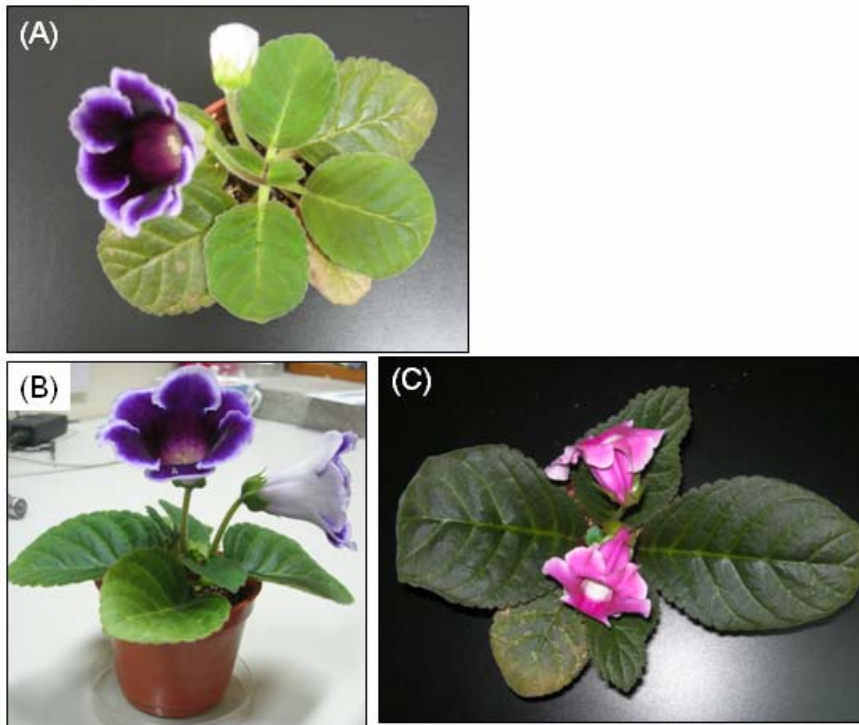
大岩桐目前仍不具有完善的基因功能研究系統，然而其為研究花部對稱性基因功能之良好材料。由於大岩桐的生長周期相對於許多模式植物如阿拉伯芥及煙草等長了許多，若使用轉殖系統研究基因功能則 regeneration 所需的時間很長，因此我們計劃在大岩桐上建立效率較高的 VIGS 系統，藉以研究大岩桐花部對稱基因之功能，以及作為其他苦苣苔科植物建立 VIGS 系統之參考。本研究選用 TRV、CymMV 及 TMV 三種曾被報導可能可感染大岩桐或其他苦苣苔科植物的病毒接種大岩桐，接著抽取接種上位葉之 RNA 用 RT-PCR 分析哪些病毒對大岩桐具有系統性感染的能力。之後用 *PDS* 為報導基因插入病毒載體接種大岩桐，用 RT-PCR 分析靜默的程度。若 *PDS* 靜默的效果很好，將可利用此系統對有興趣的花對稱性基因進行靜默，觀察花部性狀之轉變藉以推測花對稱性基因之功能。若靜默的效果不佳，將進一步嘗試農桿菌接種的方法，嘗試提高 VIGS 之效率，並使用 GUS assay 測試農桿菌接種大岩桐的最佳條件。若農桿菌媒介的 VIGS 系統能產生不錯的靜默效果，則使用此系統繼續進行花對稱性基因功能之研究。

第二章、材料與方法

一、植物材料及栽培環境

本實驗主要所用的大岩桐品系為”AVANTI”(圖二)，以下提到大岩桐如未特別註明品系則皆為”AVANTI”，其F1種子由日本SAKATA公司購得。其他大岩桐品系：”Tigrina”之F2種子由建國花市購來自交而得；”Carangola X peloria”之F2種子由屏東辜嚴倬雲保種中心陳俊銘先生提供F1植株自交而得。煙草(*Nicotiana benthamiana*)純系種子由台灣大學植物科學所鄭秋萍老師提供。

大岩桐及煙草種子撒播於泥炭土(peat moss)上，置於30 °C/25 °C，光照16個小時以上之生長環境，大岩桐約7~10天發芽，煙草約2~3天發芽。大岩桐長到第二對真葉萌發時(約一個半月)，移植到穴盆或三吋盆，介質為3號根基旺；煙草則待長到第四片葉子萌發之後(約一個月)，移植到穴盆或三吋盆，供接種農桿菌或病毒之用。感染TRV之植株將置於恆溫22 °C之生長箱，感染CymMV、TMV或農桿菌之植株將置於28 °C/25 °C之生長環境。



圖二、本研究所使用的各種品系大岩桐。A為主要使用的品系”AVANTI”，為園藝種大岩桐，開輻射對稱花，花色藍紫具白邊，花瓣七瓣，葉表面多毛。B為品系”Tigrina”，為園藝種大岩桐，開輻射對稱花，花色粉紅或藍紫，皆具白邊，花瓣六瓣，葉表面多毛。C為野生種品系”Carangola”與園藝大岩桐的雜交F2子代，花為輻射對稱花或兩側對稱花，花色粉紅，葉表面毛絨少，顏色深綠。

二、一般分生操作

(a)RNA 萃取

RNA 以 trizol 法萃取：取 0.1~0.2 g 植物組織放入研鉢中，加入少量液氮，迅速研磨成粉狀，加入 1 ml trizol，回溶後將溶液吸入 1.7 ml 微量離心管中。將溶液置於預冷 4 °C 的離心機，13000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液倒到新的微量離心管，加入 200 µl 99 % chloroform 劇烈搖晃混勻，再置於震盪器 80 rpm 搖晃 10 分鐘。混勻後於 4 °C，13000 rpm 離心 15 分鐘，將離心後的上清液小心吸出加到已裝有 500 µl isopropanol 的微量離心管，上下搖晃數次混勻後，於 -20 °C 放置 1~2 小時沉澱。沉澱完畢後於 4 °C，13000 rpm 離心 15 分鐘，倒掉上清液。加入 75 % 酒精 1 ml，彈起沉澱，於 4 °C，13000 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 100 % 酒精 500 µl，彈起沉澱，再於 4 °C，13000 rpm 離心 5 分鐘。將上清液倒掉，並用 tip 把多餘酒精吸乾，於 60 °C 乾浴機內放置 5 分鐘晾乾。晾乾後會呈銀色透明狀沉澱，加入 DEPC 水 20 µl，於 60 °C 乾浴機內放置 5 分鐘回溶，即得萃取之 RNA。全程在冰上操作，並須防止 RNase 之汙染。

(b)RQ1 DNase 處理

將萃取之 RNA 用 RQ1 DNase (Promega)處理，去除可能殘留之 gDNA。取 16 µl 萃取之 RNA，加入 2 µl DNase buffer、2 µl DNase、0.5 µl RNaseOUT™ Recombinant RNase inhibitor (Invitrogen)，於 PCR machine 中用 37 °C 反應 30 分鐘。反應後加入 2 µl 的 DNase inhibitor，於 PCR machine 中用 65 °C 10 分鐘停止反應。

(c)反轉錄聚合酵素鍊鎖反應(RT-PCR)

取 10 pg–5 µg RNA，加入 0.5 µl oligo dT(18)引子(100 µM)或是 0.2 µl 基因反義股專一引子(10 µM)、1 µl 10 mM dNTP Mix、0.5 µl RNase Inhibitor，補無菌水到 13 µl，於 65 °C 加熱 5 分鐘後迅速放到冰上冷卻使引子跟 RNA 黏合。接著加入 4 µl 5X

First-Strand Buffer、1 μl 0.1 M DTT、0.7 μl of SuperScript™ III RT (200 units/ μl) (Invitrogen)及0.3 μl DEPC water，混勻後在50 $^{\circ}\text{C}$ 加熱45分鐘，最後在70 $^{\circ}\text{C}$ 加熱15分鐘終止反應，即得到cDNA。將cDNA以專一引子使用Prime Taq DNA polymerase (萬造)進行PCR反應增幅，增幅後跑膠確定結果。若PCR產物之band太淡或肉眼看不到band，可將一端的專一引子換成較靠內的專一引子做nested PCR再確認。

(d)轉殖質體

將100 μl 之大腸桿菌勝任細胞預先置於冰上解凍，約1/3解凍後，取5 μl 質體加入，置於冰上10分鐘，於42 $^{\circ}\text{C}$ heat shock 45秒後，再放在冰上2分鐘。加入200 μl LB培養基在37 $^{\circ}\text{C}$ 震盪培養箱培養20分鐘，取100 μl 菌液塗在含抗生素之LB培養基上，若為藍白篩則須預先在LB培養基上塗40 μl IPTG及40 μl X-gal，在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養12~16個小時。

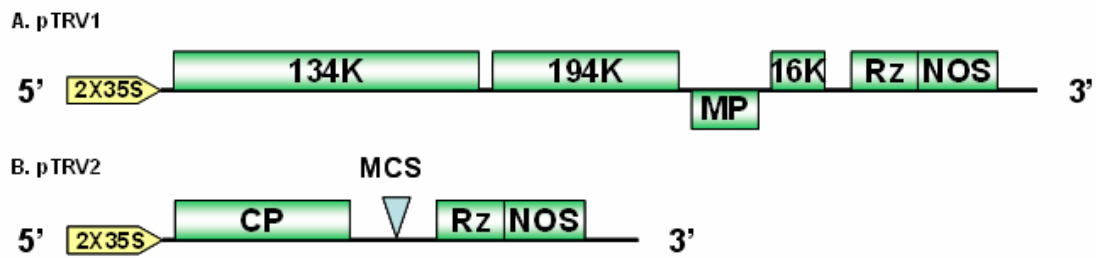
(e)菌體 glycerol stock 製備

取1 ml 菌液，加入375 μl 80%的無菌甘油，即成為菌體之 glycerol stock，可冰在-80 $^{\circ}\text{C}$ 長期保存。

三、病毒載體及其衍生載體建構

(a) TRV 衍生載體

TRV表現載體pTRV1 (pYL192)及pTRV2 (pYL156) (圖三) (Liu et al., 2002b)由台灣大學生物技術所陳仁治老師提供。



圖三、TRV 表現載體 pTRV1 及 pTRV2 的基因圖。Multiple cloning site (MCS)在 pTRV2 上。

欲插入的基因片段用基因的專一性引子，以植物的 cDNA 為模板進行 PCR 反應擴增，再經過 GENO Mini Purification Kit (Genomics) 純化，將純化產物轉殖到 pGEM-T Easy Vector (Promega) 中。取 1 μ g pTRV2 質體及 1 μ g pGEM-T 轉殖質體分別加入 0.5 μ l 限制酶 fast *Eco*R1 (Fermantas), 3 μ l 10 \times fast green Buffer, 補無菌水到 30 μ l, 於 37 $^{\circ}$ C 反應 45 分鐘, 再於 80 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘停止反應。將限制酶作用過的 pGEM-T 轉殖質體加入膠中跑電泳, 將所要的基因片段自膠中切下回收, 並用 nanodrop 確定濃度。另一方面將限制酶作用過的 pTRV2 質體加入 0.5 μ l alkaline phosphatase (CIP, Biolabs)、5 μ l 10X NEB buffer, 補無菌水到 50 μ l, 於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時。作用後的產物取 70 ng 加入 100 ng 回收的基因片段、2 u T4 DNA Ligase (Fermantas)、2 μ l 10X ligation buffer, 補無菌水到 20 μ l, 於 22 $^{\circ}$ C 反應 1 小時。反應完的產物轉殖入 DH5 α 大腸桿菌勝任細胞, 於 37 $^{\circ}$ C 培養 12 個小時後, 用基因的專一性引子進行 PCR 反應挑菌抽取質體, 而得到建構好的 TRV 衍生載體。所有 PCR 產物皆經定序確認。

(b) CymMV 衍生載體

CymMV載體pCymMV (Lu et al., 2007) (圖四、圖五)由台灣大學植物病理暨微生物所葉信宏老師提供。

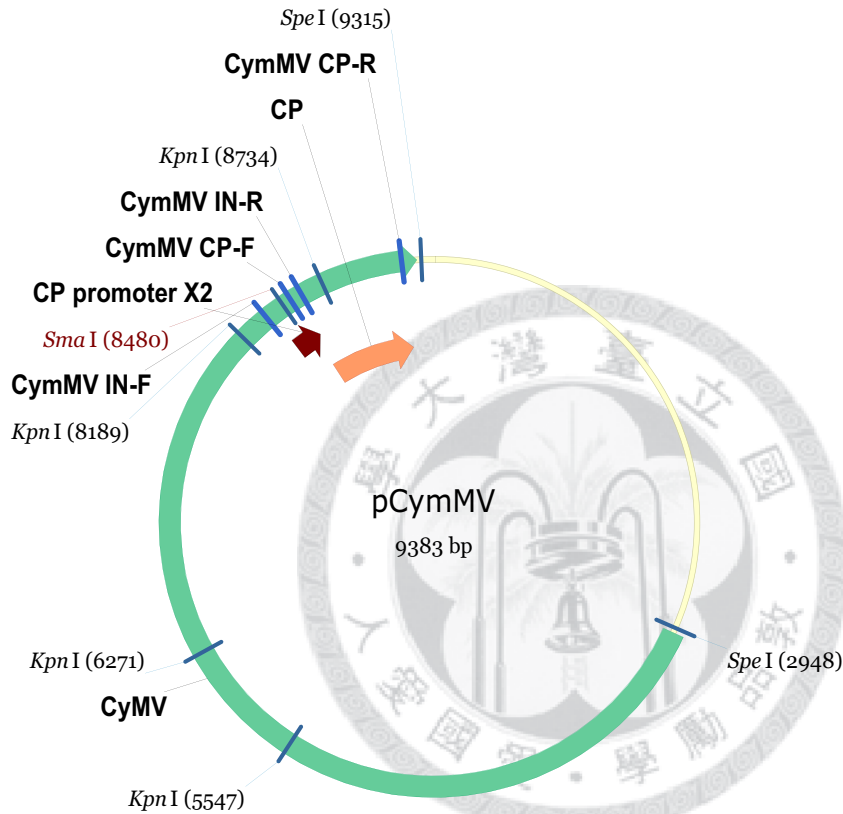
取 1 μg pCymMV 質體 DNA 加入 1 μl 限制酶 *Sma*I (Fermantas), 2 μl 10 \times Buffer Tango, 補無菌水到 20 μl , 於 30 $^{\circ}\text{C}$ 反應 1.5 小時, 再於 65 $^{\circ}\text{C}$ 反應 20 分鐘停止反應。將此產物用 GENO Mini Purification Kit (Genomics)純化, 得到線性化的 CymMV 載體, 並取 1 μl 跑膠確定濃度。平末端的基因片段用基因的專一性引子, 以植物的 cDNA 為模板, 用 phusion taq 進行 PCR 反應擴增, 再經過 GENO Mini Purification Kit (Genomics)純化而得。將 30 ng *Sma*I 處理過的 pCymMV 加入一倍到五倍量的平末端基因片段, 以及 2 μl 10X ligation buffer、1 μl T4 DNA ligase (Fermantas)、2 μl PEG, 補無菌水到 20 μl , 在 22 $^{\circ}\text{C}$ 反應 1 小時。將反應後的產物用限制酶 *Sma*I 於 30 $^{\circ}\text{C}$ 再處理 1 小時後轉殖入 TOP10 大腸桿菌勝任細胞, 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養 12 個小時後, 用基因的專一性引子進行 PCR 反應挑菌抽取質體, 而得到建構好的 CymMV 衍生載體。所有 PCR 產物皆經定序確認。

(c) TMV 衍生載體

TMV表現載體TMV-GFP (Shivprasad et al., 1999) (圖六)由台灣大學植物病理暨微生物所葉信宏老師提供。



圖四、CymMV 表現載體 pCymMV 的基因圖。



圖五、CymMV 表現載體 pCymMV 的環狀結構圖。並標示重要限制酶及引子 CymMV CP-F、CymMV CP-R、CymMV IN-F、CymMV IN-R 之位置。圓圈之白線部份為骨架 pGEM-T 之序列。



圖六、TMV表現載體的基因圖。

四、病毒感染力分析

(a) TRV病毒來源

in vivo 病毒顆粒製備

取確認已被TRV病毒感染的煙草葉片，將每五塊錢大小的葉片組織加入約600 μ l 0.05 M 磷酸緩衝液(pH = 7.0)在研鉢中磨碎，可得含TRV病毒顆粒之植物組織液。TRV病毒感染的煙草可由農桿菌攜帶pTRV1及pTRV2載體感染得之。

(b) CymMV病毒來源

in vitro transcription (胞外轉錄)

取2~5 μ g pCymMV或其衍生載體用限制酵素speI線性化，於37 $^{\circ}$ C反應1.5小時，取2 μ l 做電泳分析確認限制酵素作用完全。將線性化後的載體使用GENO Mini Purification Kit (Genomics)純化，用30ul無菌蒸餾水回溶。將回溶之溶液用抽氣離心機離心至體積小於6ul，加入2 μ l 10X reaction buffer、10 μ l 2X NTP/CAP MIX、2 μ l enzyme mix (mMESSAGE mMACHINE kit)，並用無菌蒸餾水補至總體積20ul。將溶液置於37 $^{\circ}$ C 30 分鐘反應，然後加入1 μ l GTP solution，再置於37 $^{\circ}$ C 30 分鐘，再加入1 μ l GTP solution，最後置於37 $^{\circ}$ C 2小時反應完全，即得轉錄完成之病毒RNA，欲接種時以1:5的比例加入0.05 M 磷酸緩衝液(pH = 7.0)。

in vivo 病毒顆粒製備

取可觀察到CymMV病徵的蝴蝶蘭葉片，每五塊錢大小的葉片組織加入約2 ml 0.05 M 磷酸緩衝液(pH = 7.0)在研鉢中磨碎，可得含CymMV病毒顆粒之植物組織液。

(c) TMV病毒來源

in vivo 病毒顆粒製備

取已感染TMV-GFP的煙草植株，約感染10天後放在手提式紫外光燈下照射，

選擇有GFP螢光表現的煙草葉片摘下，將每五塊錢大小的葉片組織加入約600 μ l 0.05 M 磷酸緩衝液(pH = 7.0)在研鉢中磨碎，可得含TMV病毒顆粒之植物組織液。

(d)病毒機械接種

接種時用微量滴管將胞外轉錄合成的病毒RNA溶液或經*in vivo*病毒顆粒製備所得的植物組織汁液取5~10 μ l滴在接種葉上，並在葉上灑一些金鋼沙。用手沾病毒液在葉表面磨擦2~3次，數分鐘後用無菌水清洗掉殘留在葉表上的金鋼沙，即完成病毒接種。病毒接種一到兩週後，取植株新長出的葉片萃取RNA進行RT-PCR檢測。

(e)GFP螢光檢測

TMV-GFP病毒接種一到兩週後，將植株放在手提式紫外光燈或螢光顯微鏡下，觀察新葉是否有GFP螢光表現。若有GFP表現則葉片會呈現亮綠色，未表現GFP的葉片則會呈現暗紅色。

五、農桿菌暫時性表現分析及農桿菌接種

(a)農桿菌菌株及GUS表現載體

農桿菌品系 LBA4404、GV2260、GV3101、C58C1 由台灣大學植物科學所鄭秋萍老師提供，EHA105 由中研院農業試驗所詹明才老師提供。GUS 表現載體 pCAMBIA1301 可表現 GUSINT 及 GFP 基因，由台灣大學植物科學所鄭石通老師提供。

(b)農桿菌轉形--電穿孔法

由農桿菌的glycerol stock取10 μ l加入5 ml含50 mM Rifampicin LB液體培養基的試管內，在30 $^{\circ}$ C下培養32小時。取其中1 ml加入裝有已滅菌100 ml LB液體培養

基的錐形瓶內，繼續培養約14小時(LBA4404需24小時左右)，最終O.D.₆₀₀需約為1.5~2.0。將菌液分裝到兩個50 ml離心管中，於4 °C、4000 g 離心15分鐘，倒掉上清液。接著每個離心管各加入50 ml預冷無菌水，搖晃使菌體充分懸浮，再於4 °C、4000 g 離心15分鐘，倒掉上清液，重覆此步驟4~5次。最後在每個離心管內各加入40 ml預冷無菌10 %甘油，搖晃使菌體充分懸浮，再離心15分鐘。倒掉上清液後，每個離心管各加入25 ml預冷無菌10 %甘油，搖晃使菌體充分懸浮後將兩管菌液倒在同一離心管，於4 °C、4000 g 離心15分鐘，倒掉並吸乾上清液。此時在離心管內加入400~500 µl預冷無菌10 %甘油，搖晃使菌體充分懸浮，吸取40 µl 菌液分裝到1.5 ml微量離心管內，馬上以液態氮冰凍後保存於-80 °C，即完成農桿菌轉形電穿孔法勝任細胞的製作。

將勝任細胞取出放在冰上回溫約 1 分鐘，待稍微溶解時加入欲轉形質體0.2~0.3 µl (10 ng)。接著將菌液加到電穿孔反應管的凹槽中，把電穿孔反應管的管壁擦乾，準備進行電穿孔。電穿孔時，將儀器調整在 1.9 Kv、25 CF、100 Ω。電穿孔完後在反應管中加入 1 ml LB 培養基，用微量吸管吸放混勻後吸出至 1.5 ml 微量離心管，在 37 °C 培養 1 小時，之後即可取 200 µl 菌液塗盤。在 28 °C 下培養一天半後可得轉形後的單菌落。

(c) 農桿菌轉形--凍融法

由農桿菌的 glycerol stock 取 10 µl 加入 5 ml 含 50mM Rifampicin LB 液體培養基的試管內，在 30 °C 下培養 32 小時。取其中 1 ml 加入裝有已滅菌 100 ml LB 液體培養基的錐形瓶內，繼續培養約 14 小時(LBA4404 需 24 小時左右)，最終 O.D.₅₅₀ 需約為 0.5~0.8。將菌液以 5000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，用無菌 TE buffer 再洗一次沉澱。最後將菌體用 10 ml LB 培養基重新懸浮，吸取 250 µl 菌液分裝到 1.5 ml 微量離心管內，馬上以液態氮冰凍後保存於-80 °C，即完成農桿菌轉形凍融法勝任細胞的製作

將勝任細胞置於冰上回溫，溶解約 1/3 後加入 1~5 μg 質體，再於冰上放置 5 分鐘，然後丟到液態氮裡 5 分鐘，拿出後於 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 5 分鐘，即完成轉形。將轉形完的菌液加入 1 ml LB，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 震盪 2~4 小時後，即可取 200 μl 菌液塗在含抗生素的 LB agar 培養基上。在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養一天半後可得轉形後的單菌落 (Weigel and Glazebrook, 2002)。

(d) 農桿菌接種

農桿菌的培養方法修改自台灣大學生物技術所陳仁治老師用於 VIGS 感染的流程 (Chen et al., 2004)。首先將帶有雙元質體的農桿菌菌株培養在含抗生素 Kanamycin 之 LB 培養基一天半(若為 TRV 感染需同時培養 TRV1 及 TRV2)，用分光光度計確認菌液 OD_{600} 在 1.5~2.0 之間後，離心去除 LB 培養基。接著用緩衝溶液(200 μM acetosyringone(依實驗調整濃度)、10 mM MgCl_2 、10 mM MES in ddH₂O) 將菌重新懸浮至 $\text{OD}_{600} = 0.7$ (依實驗調整濃度，若為農桿菌媒介 TRV 接種則調整到 $\text{OD}_{600} = 4.0$ ，若為農桿菌媒介 CymMV 接種則調整到 $\text{OD}_{600} = 2.0$)，靜置三小時後(若為 TRV 感染此時需將 TRV1 及 TRV2 之菌液混合)將菌液利用針筒加壓法注射到植株葉片。針筒加壓法(syringe)為最常見農桿菌接種的方法之一(Chen et al., 2004; Wang et al., 2010)，首先用針頭在接種葉背上輕刺一個小孔，接著將吸有菌液的針筒壓在傷口上擠入，見菌液滲透到整片葉片即可。

(e) GUS 組織染色 (Histochemical staining for GUS activity)

將葉片整片取下，浸泡在染劑(0.5 mM 黃血鹽、0.5 mM 紅血鹽、0.05 M Na-phosphate, pH = 7.0、0.3 % triton-X、1.25 mg/ml X-Gluc)中。真空抽氣三次後，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應一天。反應後將葉片取出至 70 % 酒精中，於 60 $^{\circ}\text{C}$ 反覆浸泡退染，待葉綠素褪完後觀察是否有藍色斑點表現。

六、fluridone 離層酸抑制劑 (ABA inhibitor)處理

取 0.033 g fluridone 粉末，以少量 95 %酒精溶解，加水到 100 ml 配成 100 μ M 之溶液(Ober and Sharp, 1994)。將此溶液用滴管滴數滴在葉表面上，或用針筒加壓注射到葉組織內，經過約一星期後觀察性狀。

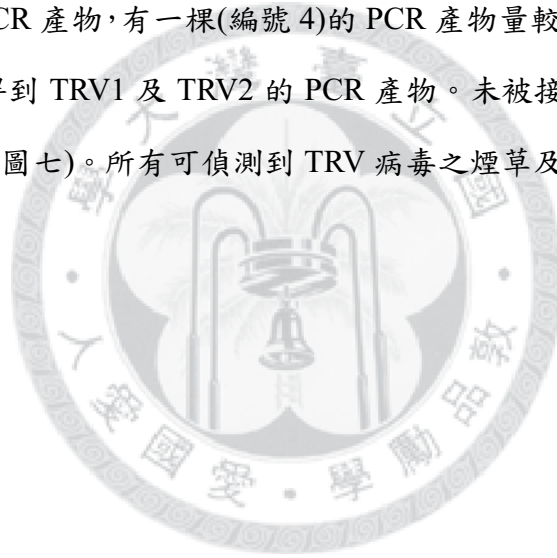


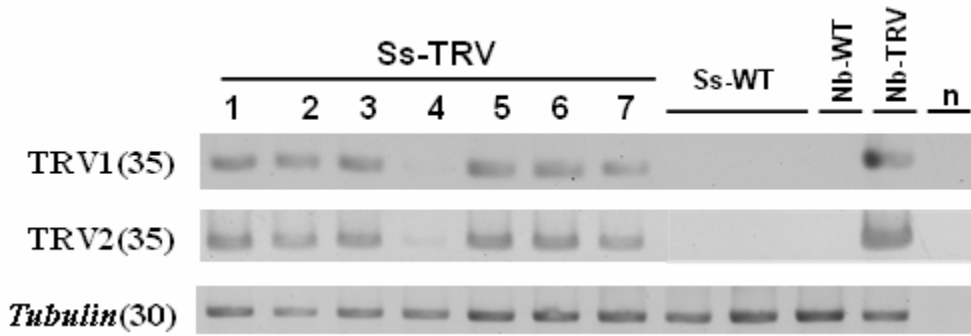
第三章、結果

一、病毒感染力分析

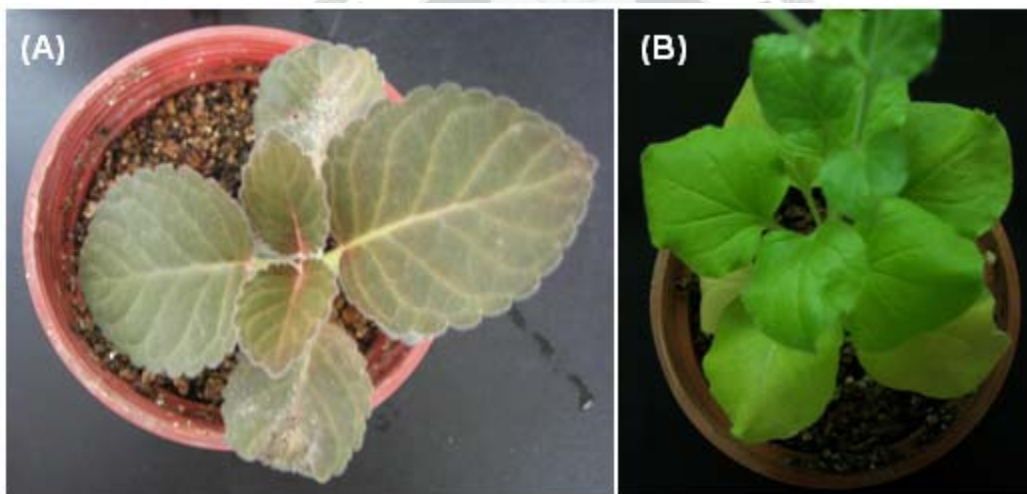
(a) TRV

我們用被 TRV 感染的煙草組織液機械接種”AVANTI”大岩桐及煙草。經過 19 天後取接種之上位葉抽 RNA 用引子 TRV1-F 及 TRV1-R 做 RT-PCR 偵測 TRV1，以引子 PYL156-F 及 PYL156-R 做 RT-PCR 偵測 TRV2，以引子 Tuba-F 及 Tuba-R 做 RT-PCR 偵測 *Tubulin* 的表現量作為控制組。七棵被接種的大岩桐皆可在膠上看到 TRV1 及 TRV2 之 PCR 產物，有一棵(編號 4)的 PCR 產物量較少，應為病毒量較低；被接種的煙草亦可得到 TRV1 及 TRV2 的 PCR 產物。未被接種的大岩桐及煙草皆無偵測到 TRV 病毒(圖七)。所有可偵測到 TRV 病毒之煙草及大岩桐皆無明顯病徵(圖八)。





圖七、用帶 TRV 的煙草組織液接種"AVANTI"大岩桐及煙草，接種經過 19 天後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果。由上到下依序為 TRV1、TRV2、及 *Tubulin* (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Ss-TRV 為 TRV 接種的"AVANTI"大岩桐，共有 14 棵，數字為植株編號。Ss-WT 為未經處理的"AVANTI"大岩桐；Nb-WT 為未經處理的煙草；Nb-TRV 為 TRV 接種的煙草；n 為未加核酸的負控制組。



圖八、被 TRV 接種 19 天後可用 RT-PCR 在系統葉偵測到 TRV 序列的"AVANTI"大岩桐及煙草。A 為接種過的"AVANTI"大岩桐，B 為接種過的煙草，皆無明顯病徵。

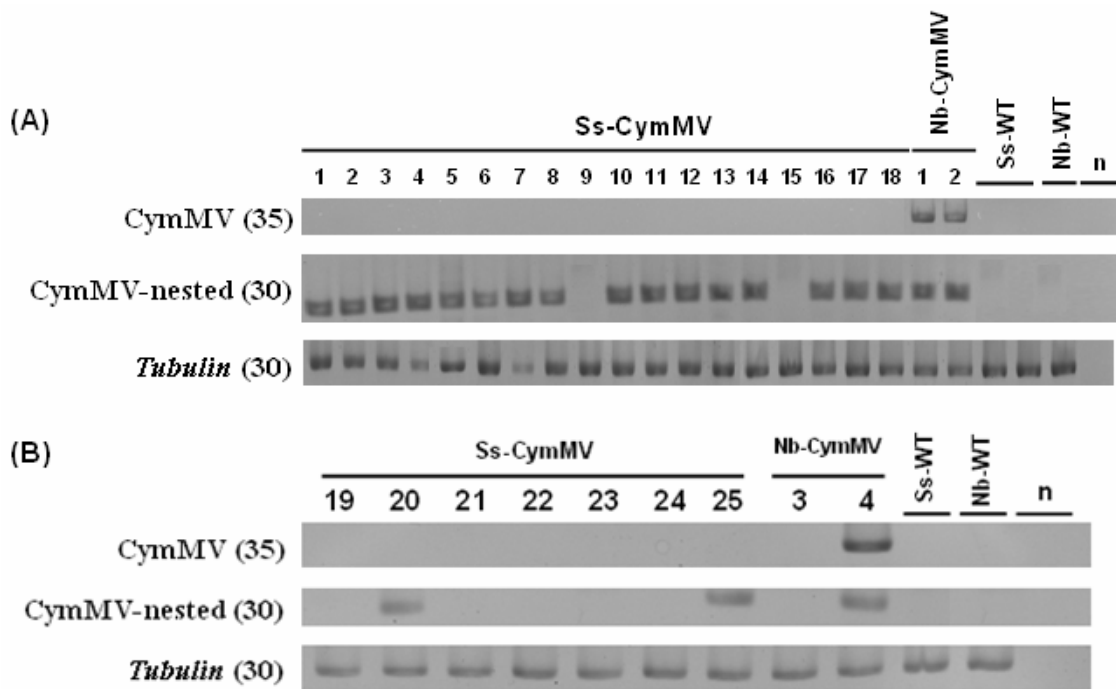
(b) CymMV

我們用兩種方法來製備 CymMV 的病毒。一種是直接取有 CymMV 病徵的蘭花葉片，磨碎後得到 CymMV 之病毒顆粒；另一種是將 CymMV 之病毒載體進行胞外轉錄，而得到 CymMV 之 RNA。

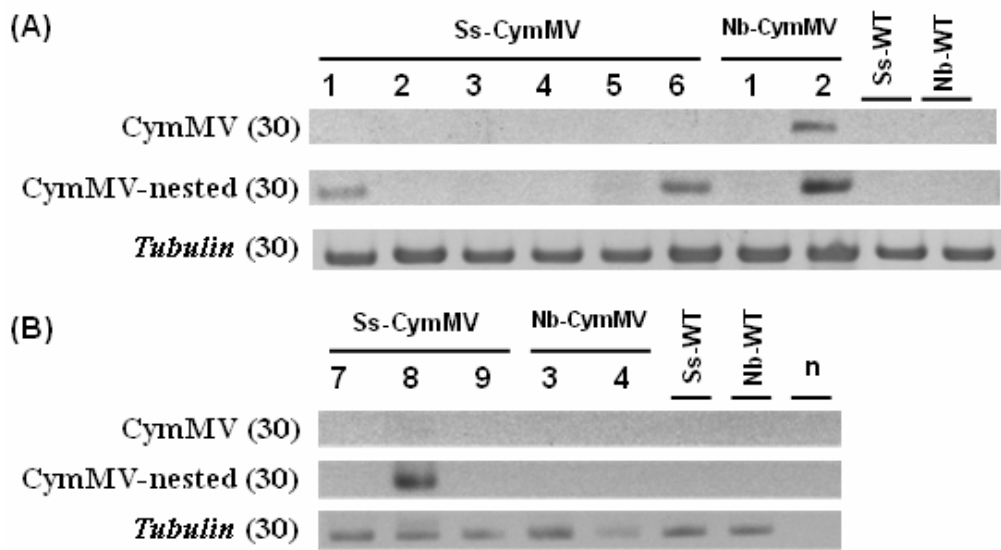
我們取已感染 CymMV 的蝴蝶蘭葉片組織液機械接種"AVANTI"大岩桐及煙草，經過 15 天後取接種之上位葉抽 RNA 用引子 CymMV CP-F 及 CymMV CP-R 做 RT-PCR 偵測 CymMV，兩次重覆之 25 棵大岩桐皆檢測不出 CymMV 的序列，而四棵煙草中有三棵可檢測到 CymMV。將得到的 PCR 產物用引子 CymMV Ha-F 及 CymMV CP-R 做 nested PCR 進一步檢測，有 20 棵大岩桐可得到 CymMV 之 PCR 產物。所有未接種之大岩桐及煙草皆無檢測到 CymMV(圖九)。

用胞外轉錄得到的 CymMV RNA 接種"AVANTI"大岩桐及煙草，經過約 15 天後取接種之上位葉抽 RNA，兩次重覆總計九棵大岩桐用引子 CymMV CP-F 及 CymMV CP-R 做 RT-PCR 皆無法看到 PCR 產物，四棵煙草有一棵可偵測到 CymMV。用 nested PCR 進一步檢測後，六棵大岩桐中有兩棵可以看到 PCR 產物；原本可偵測到 CymMV 的編號 2 煙草仍可看到 PCR 產物，但原本未偵測到 CymMV 的煙草仍然偵測不到 CymMV(圖十)。

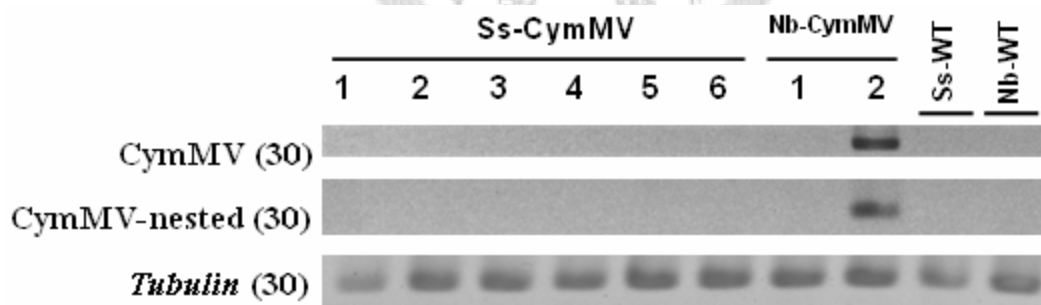
將第一次重覆用胞外轉錄的病毒 RNA 接種的"AVANTI"大岩桐及煙草，經過 40 天後重新抽 RNA，用引子 CymMV CP-F 及 CymMV CP-R 做 RT-PCR，結果六棵大岩桐皆偵測不到 CymMV，而原本感染成功的編號 2 煙草仍然可偵測到 CymMV。用引子 CymMV Ha-F 及 CymMV CP-R 做 nested PCR 進一步檢測，六棵大岩桐仍然偵測不到 CymMV(圖十一)。



圖九、用帶 CymMV 的蘭花組織液接種"AVANTI"大岩桐及煙草，接種經過兩週後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果。(A)為第一次重覆，(B)為第二次重覆。由上到下依序為 CymMV、CymMV-nested (nested PCR)、及 *Tubulin* (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Ss-CymMV 為經接種的"AVANTI"大岩桐，數字為植株編號。Ss-WT 為未經處理的"AVANTI"大岩桐；Nb-CymMV 為 CymMV 接種的煙草；Nb-WT 為未經處理的煙草； n 為未加核酸的負控制組。



圖十、用胞外轉錄出的 CymMV RNA 接種”AVANTI”大岩桐及煙草，接種經過兩週後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果。(A)為第一次重覆，(B)為第二次重覆。由上到下依序為 CymMV、CymMV-nested (nested PCR)、及 *Tubulin* (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Ss-CymMV 為經接種的”AVANTI”大岩桐，Nb-CymMV 為 CymMV 接種的煙草，數字為植株編號。Ss-WT 為未經處理的”AVANTI”大岩桐；Nb-WT 為未經處理的煙草；n 為未加核酸的負控制組。

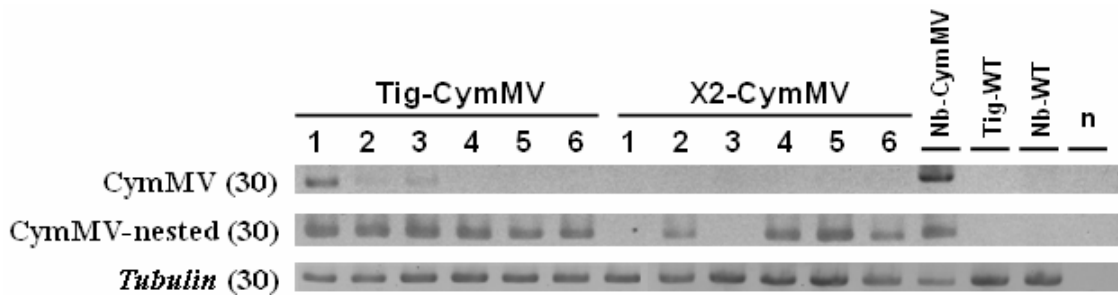


圖十一、用胞外轉錄出的 CymMV RNA 接種”AVANTI”大岩桐及煙草，接種經過 40 天後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果。由上到下依序為 CymMV、CymMV-nested (nested PCR)、及 *Tubulin* (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Ss-CymMV 為經接種的”AVANTI”大岩桐，Nb-CymMV 為經接種的煙草，數字為植株編號，同圖十。Ss-WT 為未經處理的”AVANTI”大岩桐；Nb-WT 為未經處理的煙草。

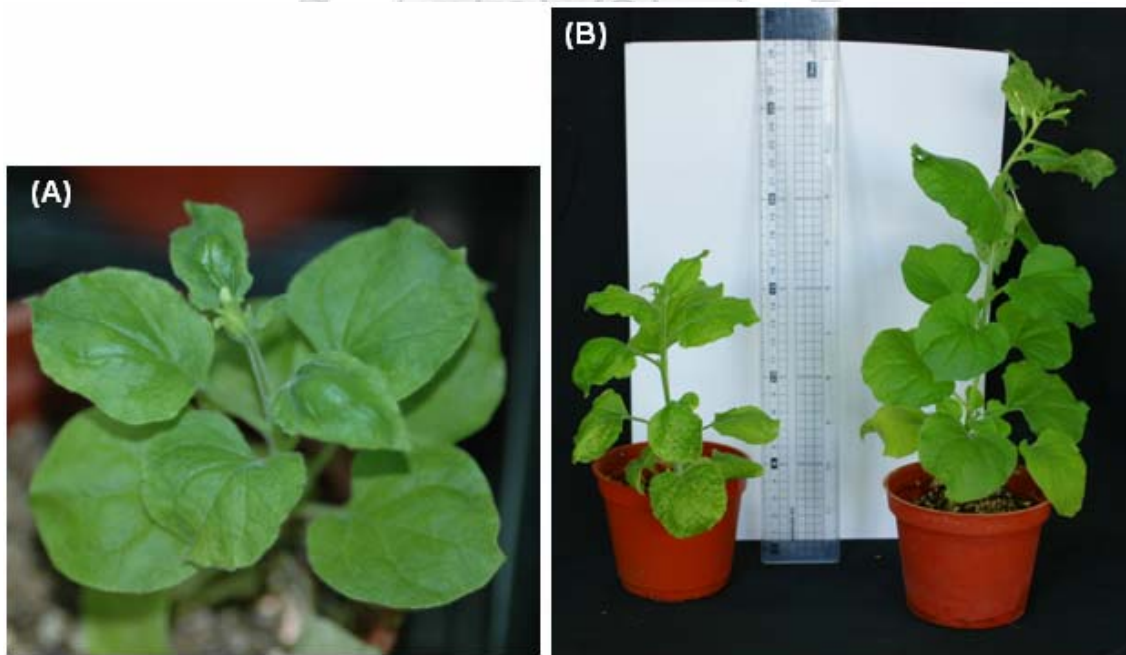
除此之外，我們用感染 CymMV 的蘭花組織液接種另外兩種大岩桐品系”Tigrina”及”Carangola X peloria”。經過 15 天後用引子 CymMV CP-F 及 CymMV CP-R 做 RT-PCR 偵測 CymMV，其中六棵”Tigrina”有三棵可在膠上看到有 PCR 的產物，六棵”Carangola X peloria”皆看不到 PCR 產物。用引子 CymMV Ha-F 及 CymMV CP-R 做 nested PCR 進一步檢測後，六棵”Tigrina”皆可得到 PCR 的產物，六棵”Carangola X peloria”則有四棵可得到 PCR 產物(圖十二)。

有偵測到感染 CymMV 之煙草，葉面出現斑駁、葉形不規則突起等病徵，且植株生長明顯緩慢(圖十三)。大岩桐無論有無偵測到 CymMV，其性狀皆跟未接種植株無明顯差異。





圖十二、用帶 CymMV 的蘭花汁液接種不同品系的大岩桐及煙草，接種經過兩週後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 的分析結果。由上到下依序為 CymMV、CymMV-nested (nested PCR)、及 *Tubulin* (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Tig-CymMV 為經接種的“Tigrina”大岩桐，X2-CymMV 為經接種的“Carangola X peloria”大岩桐，Nb-CymMV 為經接種的煙草，數字為植株編號。Tig-WT 為未經處理的“Tigrina”；Nb-WT 為未經處理的煙草；n 為未加核酸的負控制組。

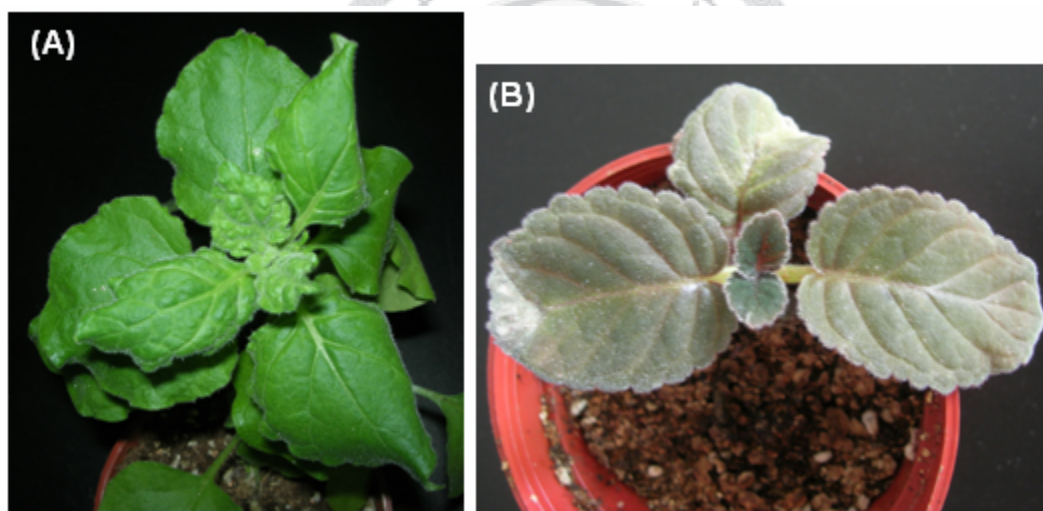


圖十三、感染 CymMV 的煙草之病徵。A 圖之煙草新生葉表面有不規則突起。B 圖左邊為接種 CymMV 一個半月後之煙草，右邊為健康植株。兩株個體為同一時間播種，接種時大小亦相仿，可看出接種後兩者生長之明顯差異，左邊煙草亦可看到葉片斑駁及凹凸不平之病徵。

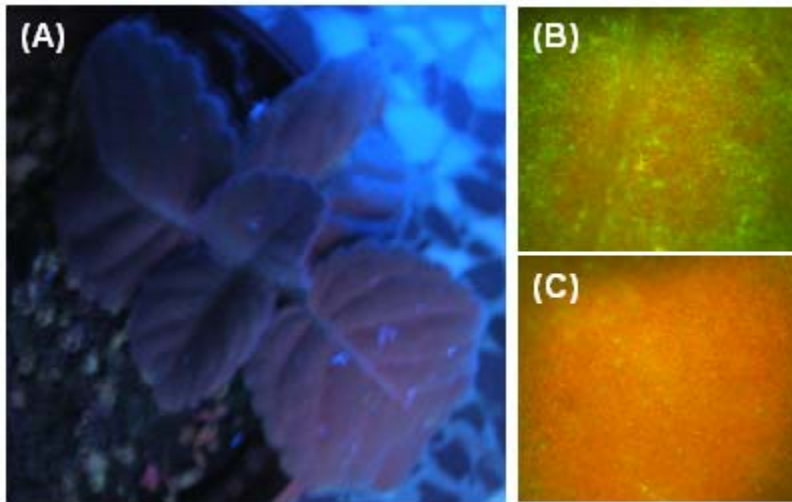
(c) TMV

我們取已感染 TMV-GFP 的煙草組織液接種煙草及大岩桐，兩週後，煙草新生葉開始有葉面凹凸狀突起之病徵，而大岩桐並無明顯病徵(圖十四)。用紫外光照射植株，煙草之接種上位葉幾乎整片皆反射亮綠色螢光；接種葉附近的幾片葉子只有葉脈附近呈綠色，其他呈暗紅色；接種下位葉多反射暗紅色螢光。

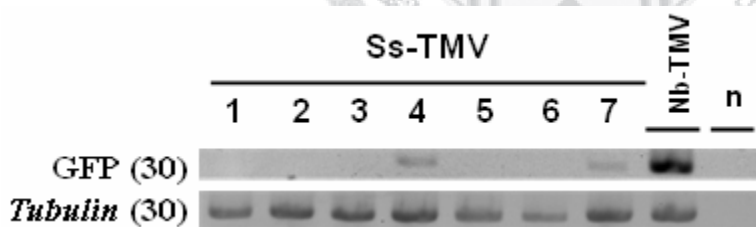
接種的七棵大岩桐在紫外光燈下皆反射暗紅色螢光，即使用螢光顯微鏡觀察也未發現 GFP 之亮綠色螢光(圖十五)。取系統葉抽 RNA 用引子 GFP-F 及 GFP-R 做 RT-PCR 檢測，煙草可偵測到明顯之 GFP 產物，七棵大岩桐有兩棵可得到少許之預期產物(圖十六)。



圖十四、接種 pTMV-GFP 之”AVANTI”大岩桐及煙草性狀。A 為接種一個月後之煙草，接種之上位葉多有不規則突起之病徵。B 為接種三個禮拜後之”AVANTI”大岩桐，並無明顯之病徵。



圖十五、接種 TMV-GFP 之”AVANTI”大岩桐及煙草照射螢光的結果。A 為接種 TMV-GFP 三週後之”AVANTI”大岩桐，用紫外光燈照射，反射出暗紅色螢光。B 為感染 TMV-GFP 之煙草葉片放在螢光顯微鏡下照射之結果，可清楚看到亮綠色螢光。C 為感染 TMV-GFP 之大岩桐葉片放在螢光顯微鏡下照射之結果，皆反射出紅色之背景螢光，並無 GFP 表現之螢光。圖中有一些綠色的亮點為大岩桐葉表面絨毛反射的自體螢光，未接種的大岩桐絨毛亦可發現(data not shown)。

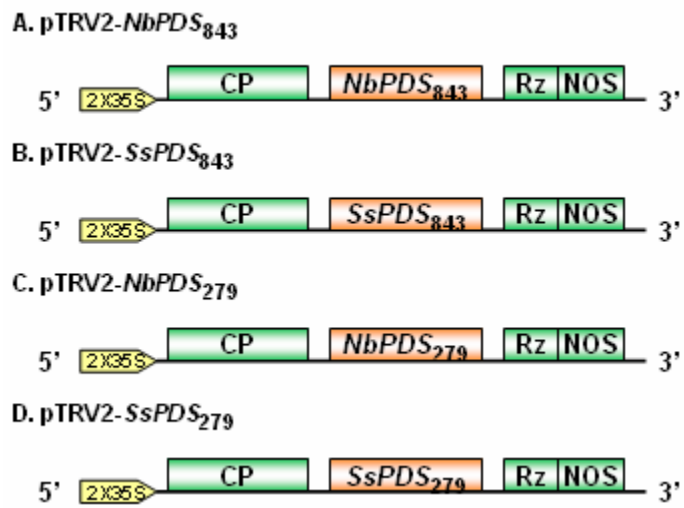


圖十六、用 TMV-GFP 接種的”AVANTI”大岩桐及煙草，接種經過兩週後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果。由上到下為 GFP 及 *Tubulin* (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Ss-TMV 為經接種的”AVANTI”大岩桐，共七棵，數字為植株編號。Nb-TMV 為接種的煙草；n 為未加核酸的負控制組。

二、*PDS* 靜默

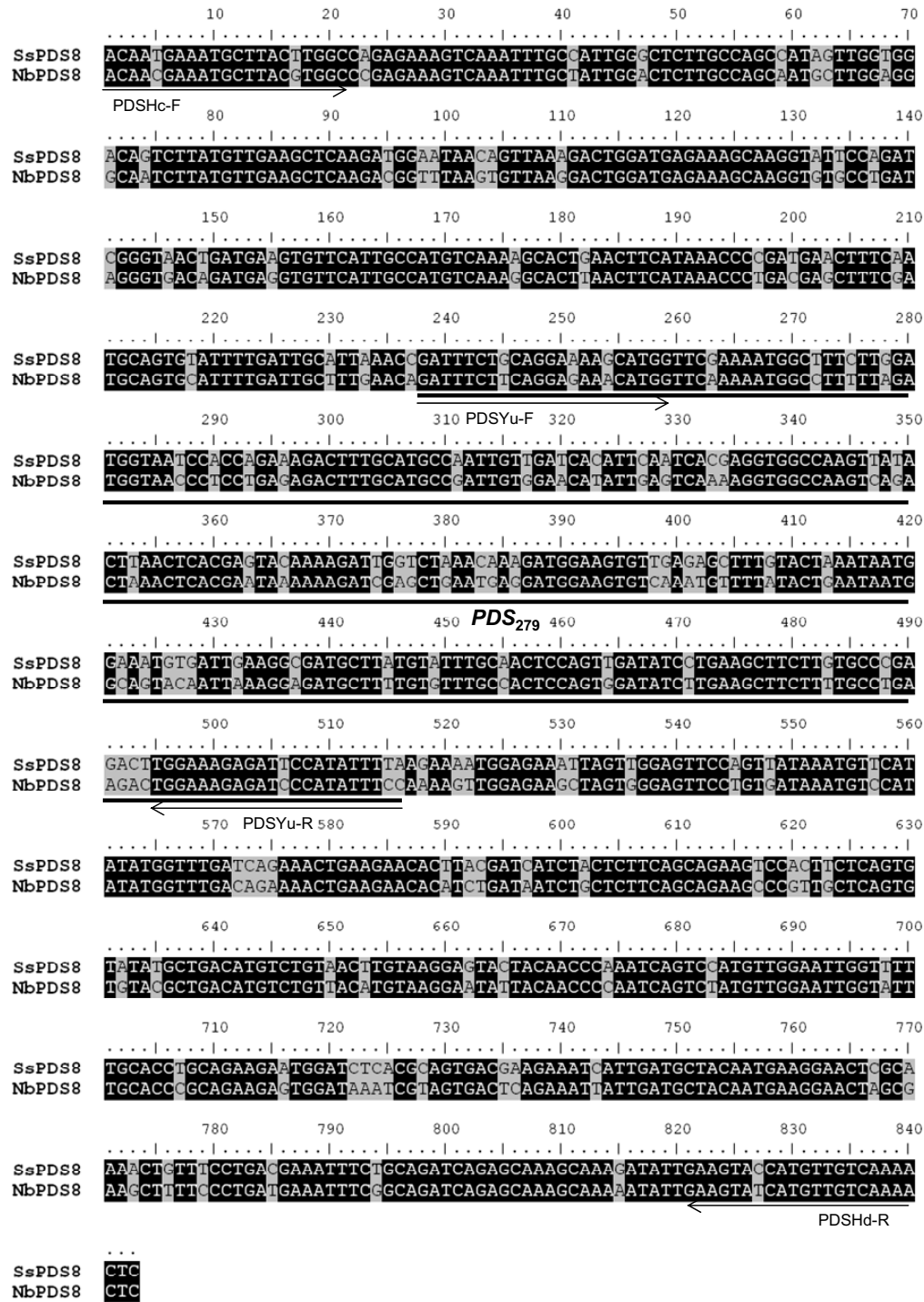
(a) 載體插入片段選擇

根據前人報導，插入片段的長度及與基因的相似程度對VIGS的效果有很大的差別(Liu and Page, 2008)。一般來說插入片段跟植物基因的同源片段越長，VIGS的效果應該越好。但插入片段太長，又可能阻礙病毒載體的系統性移動及導致插入片段容易丟失，反而導致VIGS效率下降 (Burch-Smith et al., 2004; Bruun-Rasmussen et al., 2007)。由於我們必須選擇一個能使煙草明顯觀察到靜默性狀作為正控制組又能在大岩桐內有最高的靜默效率的插入片段，我們構築插入不同*PDS*片段的TRV載體，並將其接種煙草，觀察不同插入片段對*PDS*靜默效果的差異。我們選擇煙草和大岩桐的兩種長度*PDS*片段接入TRV載體：*PDS*₂₇₉(用PDSYu-F及PDSYu-R引子進行PCR反應而得到的279bp *PDS*片段)和*PDS*₈₄₃ (用PDSHc-F及PDSHd-R引子進行PCR反應而得到的843bp *PDS*片段)，而得到pTRV2-*NbPDS*₂₇₉、pTRV2-*NbPDS*₈₄₃、pTRV2-*SsPDS*₂₇₉、pTRV2-*SsPDS*₈₄₃四種pTRV2衍生載體(圖十七)。 *SsPDS*₂₇₉跟*NbPDS*₂₇₉共差別59 bp，最長連續相同序列14 bp；*SsPDS*₈₄₃跟*NbPDS*₈₄₃共差別143 bp，最長連續相同序列21 bp(圖十八)。



圖十七、pTRV2 衍生載體的結構圖。由上到下依序為 pTRV2-*NbPDS*₈₄₃、
pTRV2-*SsPDS*₈₄₃、pTRV2-*NbPDS*₂₇₉ 及 pTRV2-*SsPDS*₂₇₉。





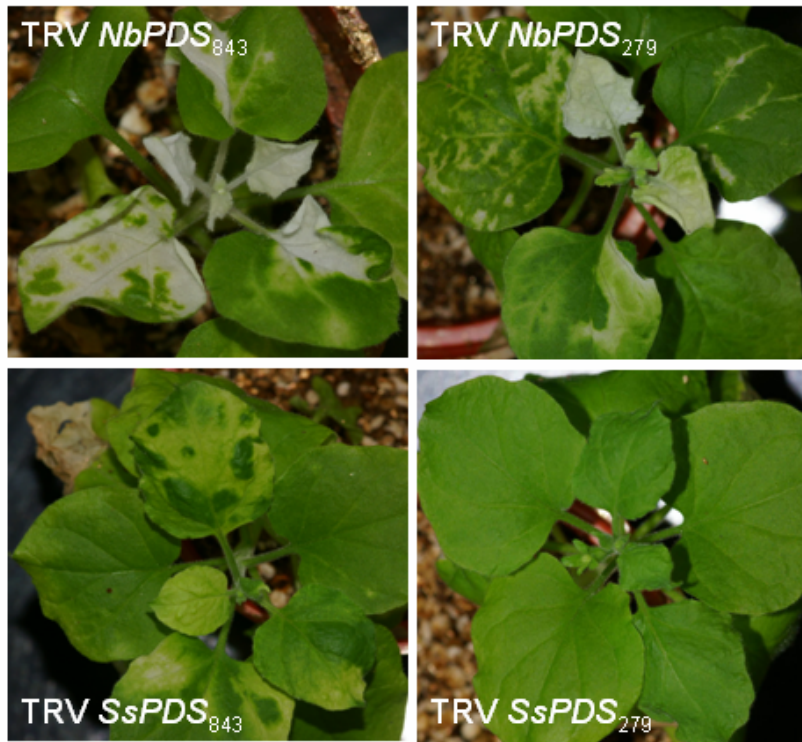
圖十八、“AVANTI”大岩桐(Ss)及煙草(Nb) *PDS*₈₄₃的全序列。中間粗線為 *PDS*₂₇₉ 的位置。箭頭為引子 PDSYu-F、PDSYu-R、PDSHc-F、PDSHd-R 的位置。黑色方框代表 *SsPDS*₈₄₃ 及 *NbPDS*₈₄₃ 序列相同的位置，灰色方框代表 *SsPDS*₈₄₃ 及 *NbPDS*₈₄₃ 序列不同的位置。

結果發現，在25 °C下接種TRV *NbPDS*₈₄₃(攜帶煙草*PDS*₈₄₃的TRV)及TRV *NbPDS*₂₇₉的煙草的新生葉片白化效果皆非常明顯；接種TRV *SsPDS*₈₄₃的煙草則有葉片黃化或斑駁白化的現象，接種TRV *SsPDS*₂₇₉則沒辦法造成白化(圖十九)。此結果顯示不同物種及長度的*PDS*插入片段即可產生不同的靜默效果，使用煙草本身的序列比選用跨物種大岩桐的序列作為插入片段靜默效果要好，TRV *SsPDS*₈₄₃也比TRV *SsPDS*₂₇₉的靜默效果要好。這可能跟最長連續相同序列的長度可能有很大的關係，如*SsPDS*₂₇₉及*NbPDS*₂₇₉有78 %的核酸序列相同，*SsPDS*₈₄₃及*NbPDS*₈₄₃有84 %的核酸序列相同，兩者相差不多。但*SsPDS*₂₇₉及*NbPDS*₂₇₉的最長連續相同序列只有14 bp，而*SsPDS*₈₄₃跟*NbPDS*₈₄₃的最長連續相同序列有21 bp，通常建議VIGS的插入片段及至少要有23個連續相同的核酸(Thomas et al., 2001)，因此連續相同序列太短可能便為TRV *SsPDS*₂₇₉無法造成白化的原因。值得一提的是*SsPDS*₈₄₃跟*NbPDS*₈₄₃的最長連續相同序列也不到23 bp，但仍可產生靜默，顯示只要更短的共同序列即可引發VIGS。

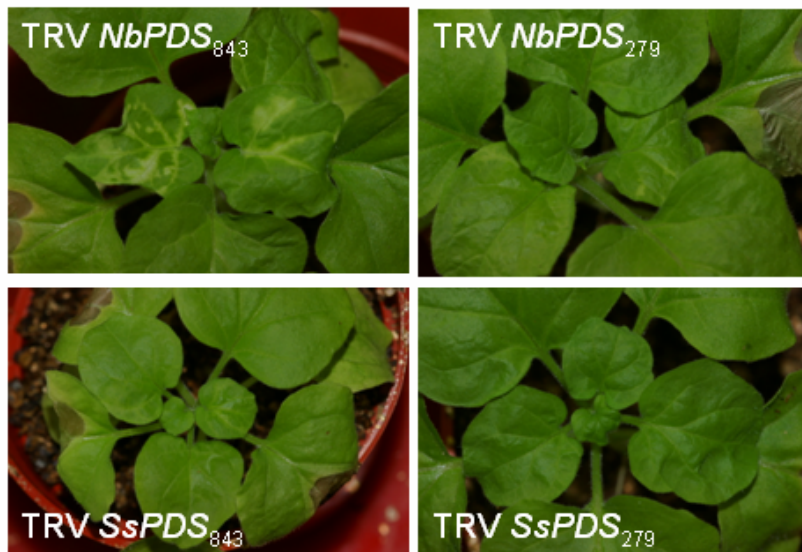
除此之外，一般認為TRV接種的植株在高溫下靜默效果較差，煙草最佳之溫度為22到25 °C，若高於32 °C則無法引發VIGS(Burch-Smith et al., 2004; Cai et al., 2007)，這很可能是由於TRV在高溫下較不容易傳播之故(Cooper and Harrison, 1973)。我們在30 °C下培養另一批接種TRV的煙草植株，結果只有TRV *NbPDS*₈₄₃接種的植株可以引發白化，其餘皆沒有產生白化現象(圖十九)。此結果再度顯示*PDS*₈₄₃比*PDS*₂₇₉所能引發的靜默效果更好，並無插入片段丟失的問題，且證明接種TRV後應將植株種在25 °C以下之溫度。

由於我們最終欲靜默的目標是大岩桐，基於跨物種片段的靜默效果不好，再加上*PDS*₈₄₃的片段靜默效果明顯比*PDS*₂₇₉好，因此後續靜默實驗將皆選擇*SsPDS*₈₄₃片段作為插入片段。由於接種TRV *SsPDS*₈₄₃在煙草上仍可清楚觀察到黃化的性狀改變，因此可作為正控制組的標記。

(A) 25°C



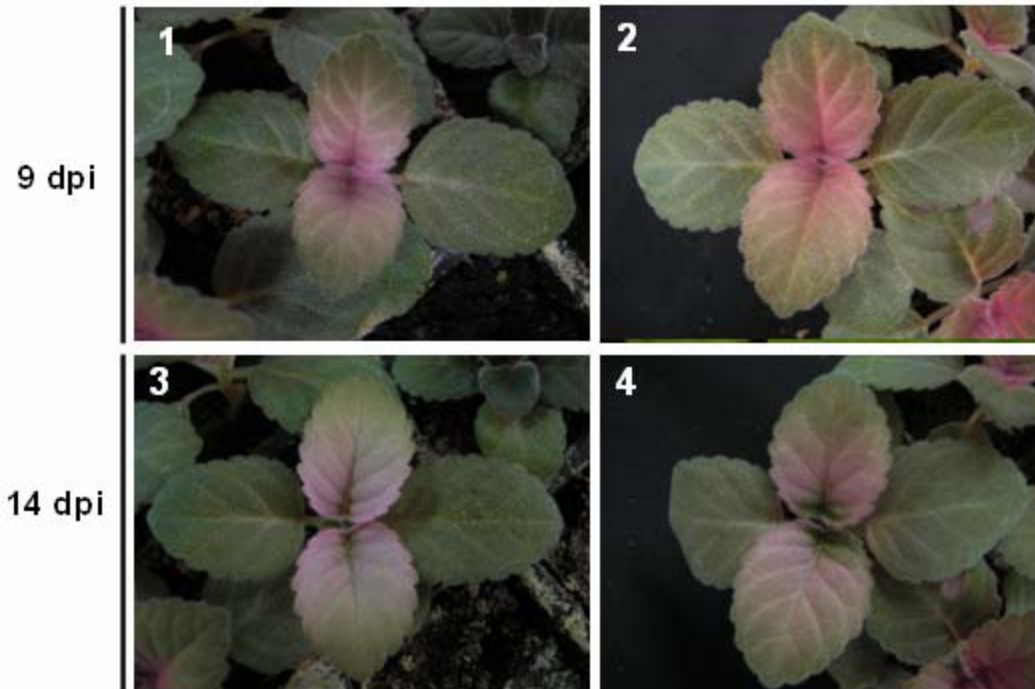
(B) 30°C



圖十九、用TRV *PDS*接種之煙草的靜默性狀。(A)：培養在25 °C。左上角為TRV *NbPDS*₈₄₃接種的煙草，右上角為TRV *NbPDS*₂₇₉接種的煙草，左下角為TRV *SsPDS*₈₄₃接種的煙草，右下角為TRV *SsPDS*₂₇₉接種的煙草。(B)：培養在30 °C。左上角為TRV *NbPDS*₈₄₃接種的煙草，右上角為TRV *NbPDS*₂₇₉接種的煙草，左下角為TRV *SsPDS*₈₄₃接種的煙草，右下角為TRV *SsPDS*₂₇₉接種的煙草。

(b) 大岩桐 *PDS* 靜默對照性狀

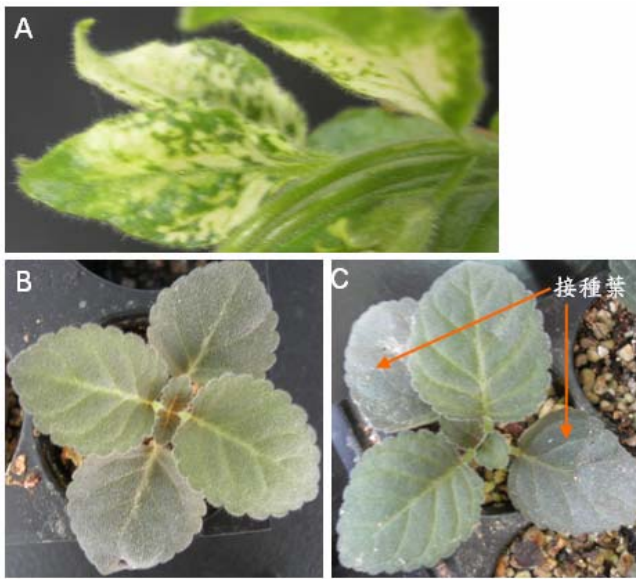
在 fluridone 處理九天後，”AVANTI”大岩桐的新生葉出現明顯褪色的情形，葉片部份變成紅色，應為花青素之顏色。十四天後，葉片的綠色大部份褪去呈略帶紅色之銀白色(圖二十)。我們推測大岩桐之 *PDS* 靜默應會出現類似之性狀改變。



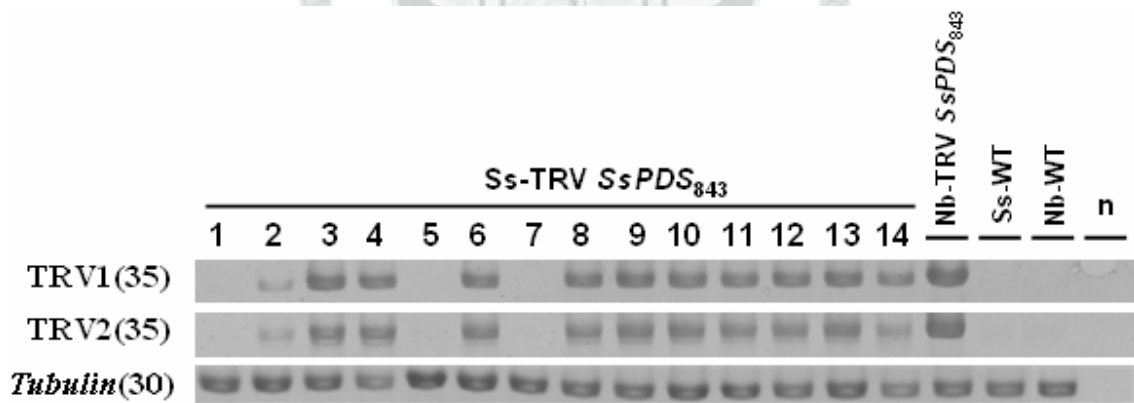
圖二十、”AVANTI”大岩桐經 fluridone 處理後第九天(9dpi)及第十四天(14dpi)之性狀轉變。1 和 3 為同一棵植株，2 和 4 為同一棵植株。

(c) TRV

我們從被帶有 pTRV2-*SsPDS*₈₄₃ 的農桿菌 GV2260 接種之煙草白化葉片，取得病毒液接種”AVANTI”大岩桐及煙草。經過約兩週之後，煙草之系統葉開始出現白斑及黃化之性狀，但所有接種之大岩桐跟負控制組之大岩桐間皆無明顯性狀差異(圖二十一)。用 RT-PCR 分析，15 棵接種 18 天後之 AVANTI 大岩桐共有 12 棵可在第一對系統葉明顯偵測到 TRV1 及 TRV2+*SsPDS*₈₄₃ 之序列，被感染率達 80 %。作為正控制組的接種煙草亦可偵測到 TRV1 及 TRV2+*SsPDS*₈₄₃ 之 PCR 產物，而未經接種的煙草及大岩桐皆無法得到病毒基因之 PCR 產物(圖二十二)。



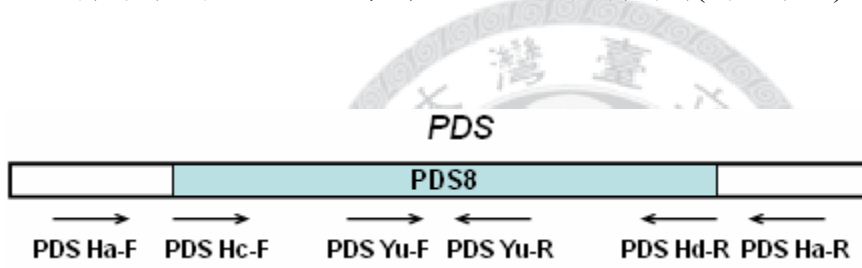
圖二十一、被 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種 18 天後的植株性狀。A 為接種過的煙草，系統葉出現白斑及黃化性狀；B 為未經接種的”AVANTI”大岩桐(負控制組)；C 為接種過的”AVANTI”大岩桐，箭頭處為接種葉。



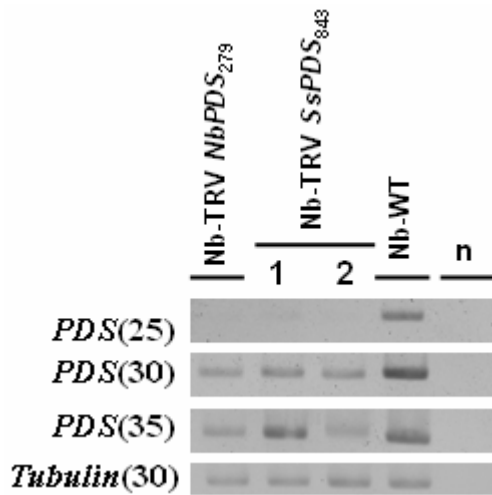
圖二十二、被 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種 18 天後的”AVANTI”大岩桐及煙草取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染結果。由上到下依序為 TRV1、TRV2 及 *Tubulin* (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Ss-TRV *SsPDS*₈₄₃ 為 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種的”AVANTI”大岩桐，共有 14 棵，數字為植株編號。其中 1,5,7 號雖有接種但並無被 TRV 感染；Nb-TRV *SsPDS*₈₄₃ 為 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種的煙草；Ss-WT 為未經處理的”AVANTI”大岩桐；Nb-WT 為未經處理的煙草；n 為未加核酸的負控制組。

用引子 PDSHa-F 及 PDSHb-R 做 RT-PCR 分析 TRV VIGS 對 *PDS* 靜默的效力(圖二十三), 可發現被 TRV *SsPDS*₈₄₃ 感染的煙草, 其 *PDS* 的表現量比起控制組確有顯著下降(圖二十四)。然而被 TRV *SsPDS*₈₄₃ 感染的大岩桐, 其 *PDS* 表現量跟經接種但並無被感染的大岩桐(*Ss*-TRV*SsPDS*8 編號 1,5,7), 以及未經接種的大岩桐, 皆無明顯差異(圖二十五)。綜合性狀及 RT-PCR 的結果顯示, TRV 雖然可感染大岩桐, 但無法在大岩桐上引發 *PDS* 的靜默。

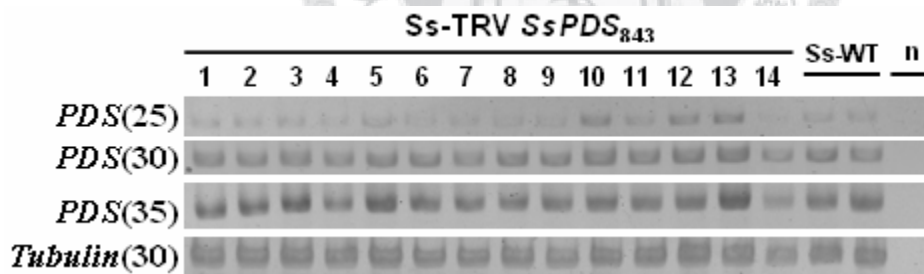
另外將大岩桐在接種 40 天後取第三對系統葉抽 RNA 偵測 TRV 的含量, 結果 12 棵原本在接種兩週後可在第一對系統葉偵測到 TRV 的大岩桐只剩編號 14 的個體可偵測到微量的 TRV2 序列, TRV1 皆無偵測到(圖二十六)。



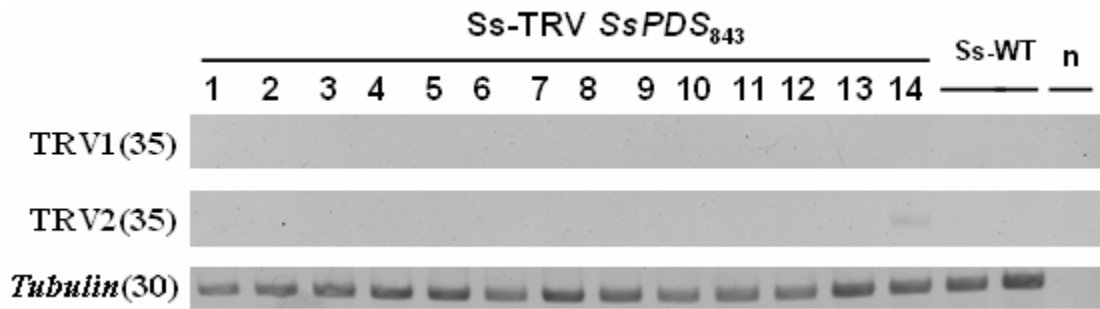
圖二十三、*PDS* 基因與引子位置示意圖。



圖二十四、被 TRV *NbPDS*₂₇₉ 及 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種 18 天後的煙草取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析 *PDS* 靜默的結果。由上到下依序為 *PDS* (25、30、35 個 cycles) 及 *Tubulin* (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Nb-TRV *NbPDS*₂₇₉ 為 TRV *NbPDS*₂₇₉ 接種的煙草；Nb-TRV *SsPDS*₈₄₃ 為 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種的煙草，共兩棵，數字為植株編號。Nb-WT 為未經處理的煙草；n 為未加核酸的負控制組。



圖二十五、被 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種 18 天後的”AVANTI”大岩桐取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析 *PDS* 靜默的結果。由上到下依序為 *PDS* (25、30、35 個 cycles) 及 *Tubulin* (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Ss-TRV *SsPDS*₈₄₃ 為經接種的大岩桐，植株編號同圖十三；Ss-WT 為未經處理的大岩桐；n 為未加核酸的負控制組。

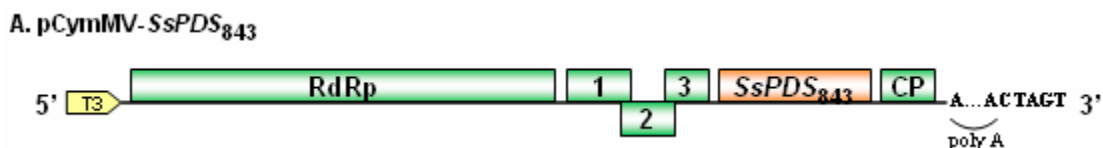


圖二十六、用 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種的"AVANTI"大岩桐，接種經過 40 天後取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染的結果。由上到下依序為 TRV1、TRV2、及 *Tubulin*(control)，括弧內為 PCR cycle 數。*Ss-TRV SsPDS*₈₄₃ 為經 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種的"AVANTI"大岩桐，數字為植株編號，同圖二十二。*Ss-WT* 為未經處理的"AVANTI"大岩桐；n 為未加核酸的負控制組。

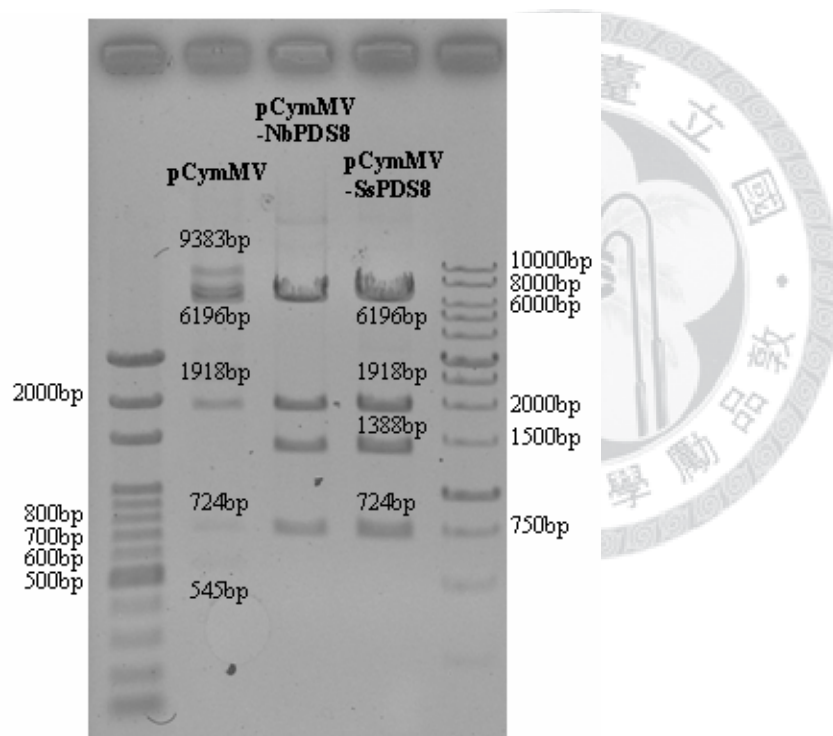


(d) CymMV

將建構好的 pCymMV*SsPDS*₈₄₃ 載體(圖二十七)，用限制酶 *KpnI* 確認 *SsPDS*₈₄₃ 確有插入載體(圖二十八)。



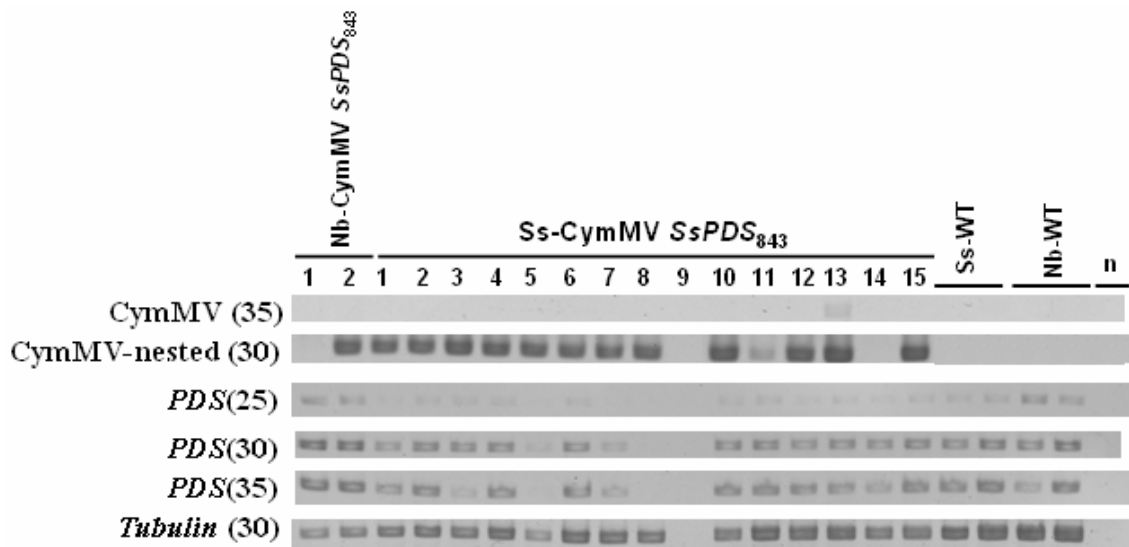
圖二十七、pCymMV-*SsPDS*₈₄₃ 的結構圖。



圖二十八、用限制酶 *KpnI* 確認建構好的 CymMV 衍生載體。pCymMV 共有四個 *KpnI* 切位，完全作用後應會得到 6196 bp、1918 bp、724 bp 及 545 bp 四段產物，其中 multiple cloning cite 在 545 bp 之片段裡面。9383 bp 則為 pCymMV 全長。pCymMV-*SsPDS*₈₄₃ 經 *KpnI* 作用後亦得到 6196 bp、1918 bp、724 bp 之產物。另外新增一段 1388 bp 之產物，大小符合原 545 bp 之片段加上插入 *PDS*₈₄₃ 之 843bp 片段，確認 pCymMV-*SsPDS*₈₄₃ 確有插入目標基因。

將 pCymMV-SsPDS₈₄₃ 胞外轉錄得到的 RNA 機械接種煙草及”AVANTI”大岩桐，接種兩週後煙草及大岩桐皆無出現白化的現象。抽取接種上位葉之 RNA 做 RT-PCR 檢測，編號 13 的大岩桐有偵測到些微的 CymMV，其餘大岩桐有 12 棵可用 nested PCR 偵測到 CymMV，編號 9 的大岩桐 RNA 萃取失敗。煙草有一棵可用 nested PCR 偵測到 CymMV，另一棵已開花的煙草完全沒偵測到 CymMV(圖二十九)。用引子 PDSHa-F 及 PDSHb-R 做 RT-PCR 分析 *PDS* 表現的情形(圖二十九)，兩棵接種煙草的 *PDS* 表現量跟未接種的煙草無明顯差異；大多數的接種大岩桐，無論有無偵測到 CymMV，包括 CymMV 表現量最高的編號 13 個體，其 *PDS* 表現量跟未接種的大岩桐亦無明顯差異。然而編號 5、7、8 的大岩桐其 *PDS* 表現量明顯比控制組低，有可能是基因靜默。





圖二十九、被 CymMV SsPDS₈₄₃ 接種 15 天後的”AVANTI”大岩桐及煙草取系統葉抽 RNA 做 RT-PCR 分析感染及 PDS 靜默的結果。由上到下依序為 CymMV、CymMV-nested (nested PCR)、PDS (25、30、35 個 cycles)及 Tubulin (control)，括弧內為 PCR cycle 數。Nb-CymMV SsPDS₈₄₃ 為經 CymMV SsPDS₈₄₃ 接種的煙草，Ss-CymMV SsPDS₈₄₃ 為經 CymMV SsPDS₈₄₃ 接種的”AVANTI”大岩桐，數字為植株編號。Ss-WT 為未經處理的”AVANTI”大岩桐；Nb-WT 為未經處理的煙草；n 為未加核酸的負控制組。

三、農桿菌暫時性表現分析

為了得到最佳的農桿菌感染條件，本研究用攜帶 pCAMBIA1301 的農桿菌接種”Tigrina”大岩桐葉片，每次接種並有煙草做為正控制組。在 510 片接種過的”Tigrina”大岩桐葉片中，共有 20 片經染色後有得到 GUS 訊號，總感染率約為 3.9%。由於每個樣品 GUS 訊號的強弱不一，我們將有 GUS 訊號的樣品依表現面積及表現位置分成 A、B、C 三個等級以幫助分析(表一)(圖三十)。

表一、被攜帶 pCAMBIA1301 的農桿菌接種的”Tigrina”大岩桐葉片，經染色後有 GUS 訊號之葉片樣品分級之等級標準。

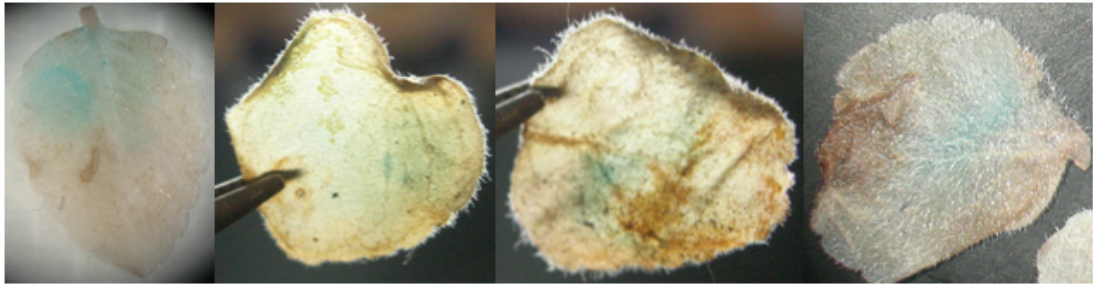
level description

A GUS 有明顯訊號且面積超過葉片的 1/10

B 在葉肉有 GUS 訊號，但訊號強度及面積不及 A 級標準

C 只在葉片受傷或爛掉處有 GUS 訊號

A



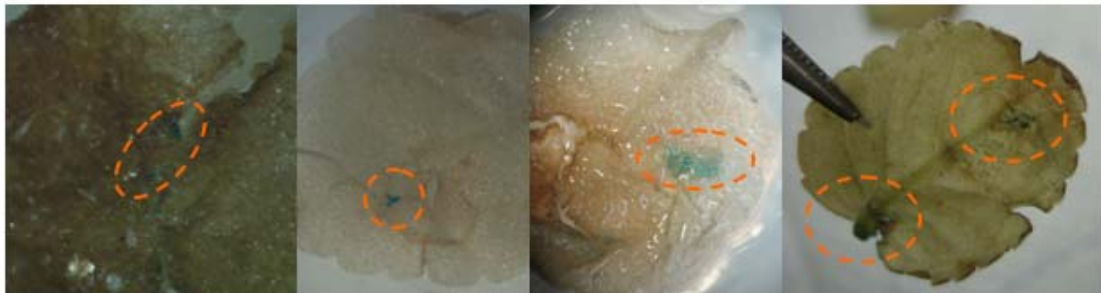
農桿菌: GV2260
AS濃度: 400uM

農桿菌: GV2260
AS濃度: 200uM

農桿菌: GV2260
AS濃度: 200uM

農桿菌: GV2260
AS濃度: 400uM

B



農桿菌: GV3101
AS濃度: 400uM

農桿菌: GV3101
AS濃度: 400uM

農桿菌: GV3101
AS濃度: 400uM

農桿菌: LBA4404
AS濃度: 200uM



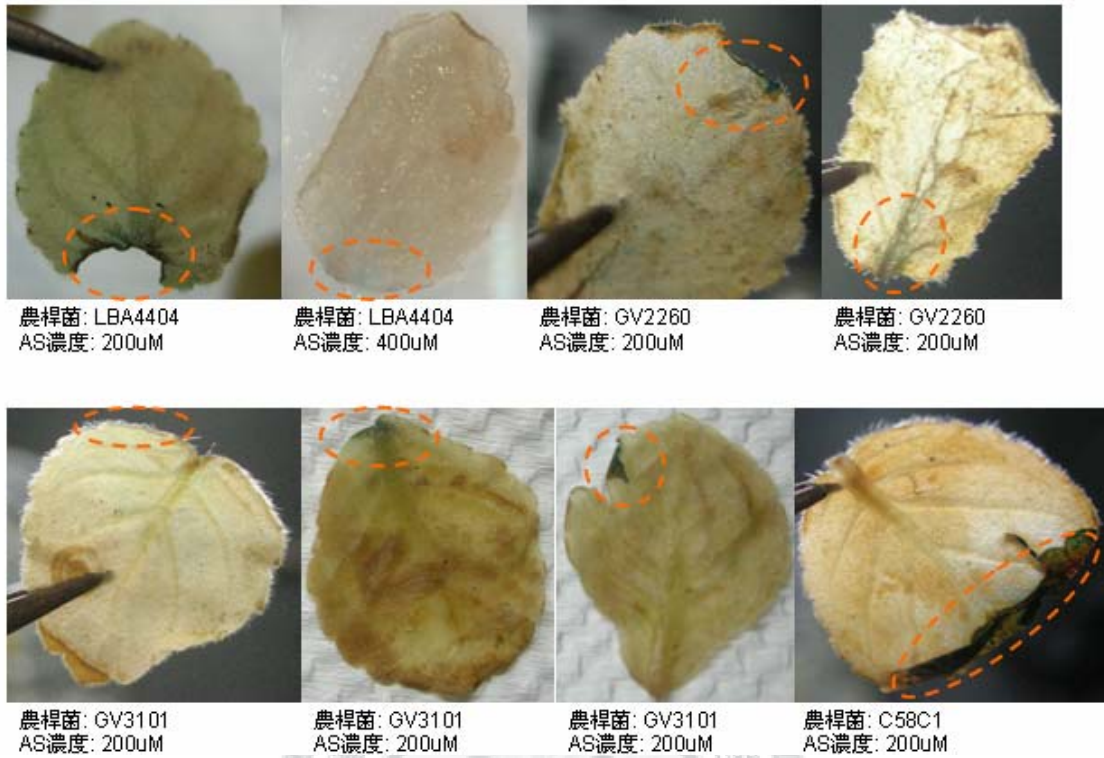
農桿菌: C58C1
AS濃度: 200uM

農桿菌: C58C1
AS濃度: 400uM

農桿菌: C58C1
AS濃度: 400uM

農桿菌: C58C1
AS濃度: 400uM

C



圖三十、被攜帶 pCAMBIA1301 的農桿菌接種的”Tigrina”大岩桐葉片，經染色後有 GUS 訊號之葉片樣品。左上角為其染色等級，每個樣品所接種的農桿菌菌種及 AS (acetosyringone)濃度標示如上。虛線圈圈為有 GUS 訊號之位置。

以下為不同因子之測試結果：

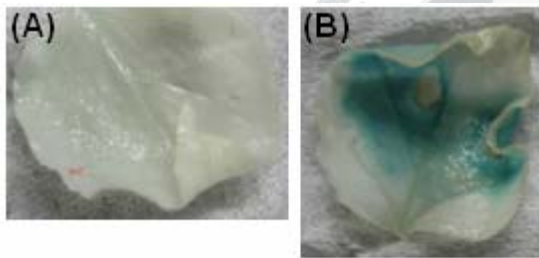
(a) 農桿菌品系

固定其他條件，針對四種不同農桿菌品系 LBA4404、GV2260、GV3101、C58C1 分析：在三次試驗內，LBA4404 在 73 片”Tigrina”大岩桐葉中有 3 片有 GUS 訊號，訊號等級為 B、C、C，平均染色成功率為 4.11 %；GV2260 在 75 片”Tigrina”大岩桐葉中有 6 片有 GUS 訊號，訊號等級為 A、A、A、A、C、C，平均染色成功率為 8.00 %；GV3101 在 72 片”Tigrina”大岩桐葉中有 5 片有 GUS 訊號，訊號等級為 B、B、C、C、C，平均染色成功率為 6.94 %；C58C1 在 76 片”Tigrina”大岩桐葉中有 5 片有 GUS 訊號，訊號等級為 B、B、B、B、C，平均染色成功率為 6.58 % (表二)。綜合染色成功率及訊號等級，農桿菌為 GV2260 時是效果最佳的處理。

EHA105 只有接種在 AVANTI 的數據，在 30 片 AVANTI 大岩桐葉中沒有任何樣品發現 GUS 訊號，但用 GV2260 接種 AVANTI，在兩次重複內的 54 片葉片樣品中亦無發現任何訊號。另外用 GV2260 接種”Carangola X peloria”品系，32 片葉片樣品內有一片可發現 GUS 訊號，訊號等級為 D。每次實驗以煙草作為正控制組，皆有 GUS 訊號表現(圖三十一)。

表二、固定 acetosyringone (AS)濃度，對四種農桿菌品系進行 GUS assay 試驗之結果。將攜帶 pCAMBIA1301 的不同農桿菌用針筒加壓法注射”Tigrina”大岩桐葉片，兩天後取葉片進行 GUS 組織染色，觀察成功染色的機率及訊號強度的等級。結果農桿菌為 GV2260 時在 75 片葉片中有 6 片有 GUS 訊號，染色成功率為 8.00%，染色訊號等級為 A、A、A、A、C、C，是效果最佳的處理。

| <i>Agrobacterium</i> strain | 1 st (AS=200 μ M) | | 2 nd (AS=400 μ M) | | 3 rd (AS=400 μ M) | | total | |
|--------------------------------|----------------------------------|---------|----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|-------|-------------|
| | ratio | level | ratio | level | ratio | level | rate | level |
| LBA4404 | 2/21 | B,C | 0/28 | | 1/24 | C | 4.11% | B,C,C |
| GV2260 | 4/23 | A,A,C,C | 0/28 | | 2/24 | A,A | 8.00% | A,A,A,A,C,C |
| GV3101 | 3/20 | C,C,C | 0/28 | | 2/24 | B,B | 6.94% | B,B,C,C,C |
| C58C1 | 2/22 | B,C | 0/28 | | 3/24 | B,B,B | 6.58% | B,B,B,B,C |



圖三十一、煙草葉片 GUS 染色結果。A 為未接種的煙草葉片，B 為經接種農桿菌-pCAMBIA1301 的煙草葉片。

(b) AS 濃度

針對五個 acetosyringone 濃度等級：0、200、400、600、800 μM 分析：在兩次試驗固定農桿菌品系的試驗中，只有 200 及 400 μM 的處理各有一片”Tigrina”大岩桐葉有 GUS 訊號，0 μM 、600 μM 、800 μM 皆無樣品有 GUS 訊號(表三)。由於這兩次試驗的成功率太低，而無法比較 200 及 400 μM 的處理何者效果較好，因此加入測試農桿菌品系時的結果一併分析。結果 200 μM 在 148 片”Tigrina”大岩桐葉中有 11 片有 GUS 訊號，訊號等級為 A、A、B、B、C、C、C、C、C、C，平均感染率為 7.43 %；400 μM 在 270 片”Tigrina”大岩桐葉中有 9 片有 GUS 訊號，訊號等級為 A、A、B、B、B、B、B、B、C，平均感染率為 3.33 % (表四)。綜合染色成功率及訊號等級，AS 濃度為 200 μM 時是效果最佳的處理。每次實驗以煙草作為正控制組，皆有 GUS 訊號表現。



表三、固定農桿菌品系，對五個 acetosyringone 濃度等級進行 GUS assay 試驗之結果。將攜帶 pCAMBIA1301 的農桿菌用不同 acetosyringone 濃度的 inoculation buffer 回溶，用針筒加壓法注射”Tigrina”大岩桐葉片，兩天後取葉片進行 GUS 組織染色，觀察成功染色的機率及訊號強度的等級。其中只有 200 及 400 μM 的處理各有一片”Tigrina”大岩桐葉有 GUS 訊號，0 μM 、600 μM 、800 μM 皆無樣品有 GUS 訊號。

| acetosyringone concentration (μM) | 1 st (GV2260) | | 2 nd (GV3101) | | total | |
|---|--------------------------|-------|--------------------------|-------|-------|-------|
| | ratio | level | ratio | level | rate | level |
| 0 | | | 0/30 | | 0.00% | |
| 200 | 0/32 | | 1/30 | C | 1.61% | C |
| 400 | 0/32 | | 1/30 | B | 1.61% | B |
| 600 | | | 0/30 | | 0.00% | |
| 800 | 0/32 | | | | 0.00% | |

表四、將表三之結果，加入測試不同農桿菌品系試驗的資料，分析不同 acetosyringone 濃度等級對 GUS assay 結果之影響。結果 AS 濃度為 200 Mm 時在 148 片”Tigrina”大岩桐葉中有 11 片有 GUS 訊號，平均染色成功率為 7.43%，為效果最佳的處理。

| acetosyringone concentration (μM) | total | | |
|---|--------|-------|-----------------------|
| | ratio | rate | level |
| 0 | 0/30 | 0.00% | |
| 200 | 11/148 | 7.43% | A,A,B,B,C,C,C,C,C,C,C |
| 400 | 9/270 | 3.33% | A,A,B,B,B,B,B,B,C |
| 600 | 0/30 | 0.00% | |
| 800 | 0/32 | 0.00% | |

四、農桿菌媒介 VIGS

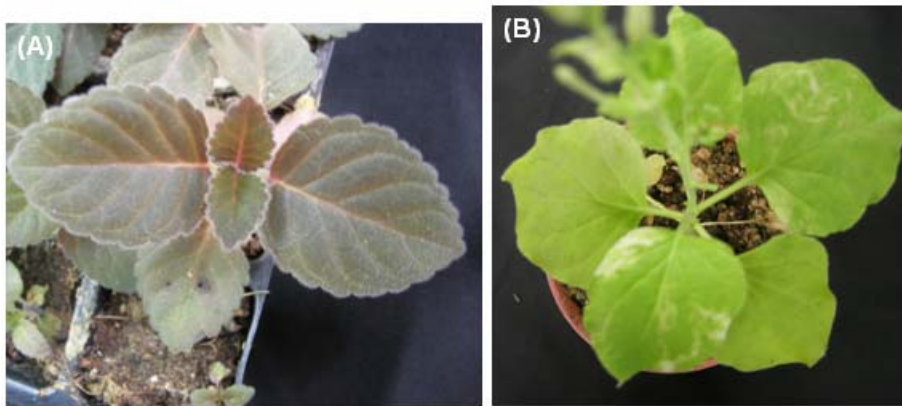
綜合農桿菌暫時性表現分析的結果，我們認為以農桿菌品系 GV2260 及 AS 濃度為 200 μ M 為最好的組合。

(a) TRV

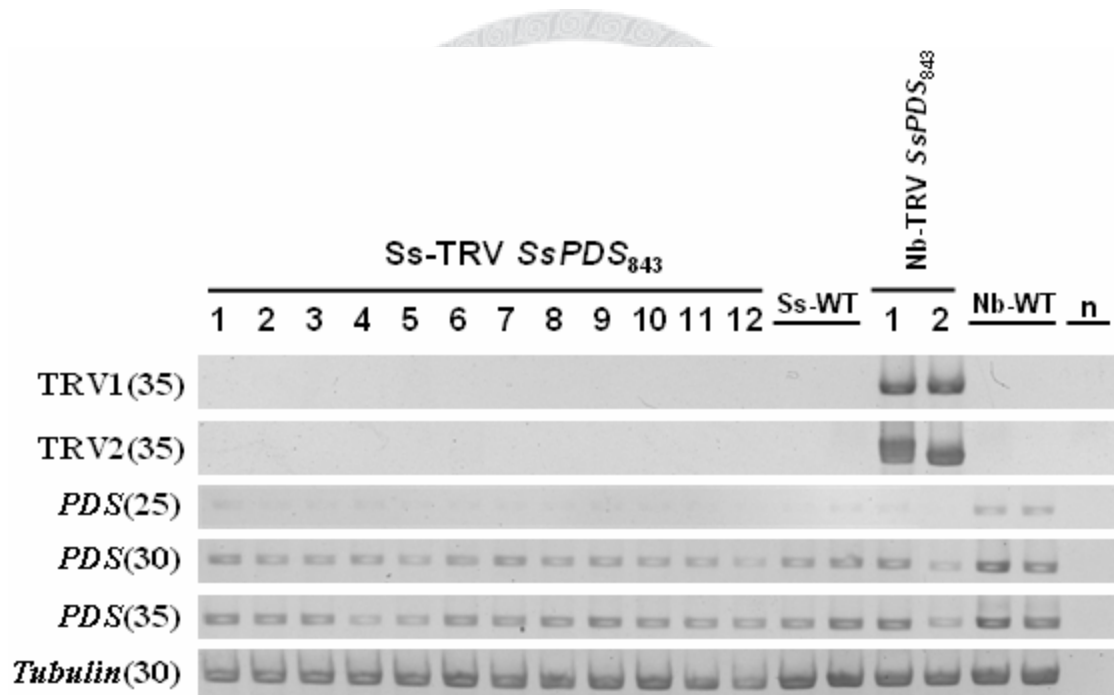
我們將 pTRV1 及 pTRV2-*SsPDS*₈₄₃ 以電穿孔方式轉殖到農桿菌 GV2260 中，以 AS 濃度為 200 μ M 為條件接種大岩桐及煙草。接種 17 天後觀察性狀，12 棵大岩桐皆無出現白化現象，煙草則有明顯白化現象(圖三十二)。

抽取 RNA 做 RT-PCR 檢測，12 棵大岩桐皆無偵測到 TRV1 及 TRV2 之序列，*PDS* 的表現量跟未接種的大岩桐亦無明顯差別。作為正控制組的煙草可偵測到明顯之 TRV 病毒，其 *PDS* 表現量比起未接種的煙草亦有明顯下降(圖三十三)。





圖三十二、被 GV2260 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種 17 天後的植株性狀。A 為接種過的大岩桐，並無白化；B 為接種過的煙草，上位葉出現白化性狀。



圖三十三、用 RT-PCR 分析被 GV2260 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種的大岩桐及煙草被 TRV 感染的情形及 *PDS* 基因靜默的程度。由上到下依序為 TRV1、TRV2、*PDS*(25、30、35 個 cycles)及 *Tubulin*(control)，括弧內為 PCR cycle 數。Ss-TRV *SsPDS*₈₄₃ 為 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種的大岩桐，Nb-TRV *SsPDS*₈₄₃ 為 TRV *SsPDS*₈₄₃ 接種的煙草，數字為植株編號。Ss-WT 為未經處理的大岩桐；Nb-WT 為未經處理的大岩桐；n 為未加核酸的負控制組。

第四章、討論

大岩桐的系統葉可偵測到 TRV，但並未引發 VIGS

病毒對植株的感染力是能否引發 VIGS 最重要的關鍵(Constantin et al., 2004)，因此我們利用病毒機械接種測試了三種病毒對大岩桐的感染力。接近 90 % 的大岩桐在接種 TRV 後約 2~3 個禮拜可在第一對系統葉偵測到病毒，顯示 TRV 具有感染大岩桐及在大岩桐內系統性移動的能力。

儘管 TRV 對大岩桐似乎有不錯的感染率，然而卻沒有辦法在大岩桐引發 VIGS。被 TRV *SsPDS₈₄₃* 接種的植株，有 80 % 左右皆可偵測到 TRV 病毒的存在，此結果跟用空的 TRV 接種植株的結果相仿，顯示在 TRV 之載體中插入外加片段並不會嚴重影響 TRV 對大岩桐的感染能力。然而 *PDS* 的表現量在被 TRV *SsPDS₈₄₃* 接種成功的植株、接種失敗的植株(未偵測到 TRV 病毒)，及沒有接種病毒的植株皆無明顯差異。相對的，被 TRV *SsPDS₈₄₃* 接種成功的煙草其 *PDS* 之表現量便有明顯下降，也有出現斑駁黃化之靜默特徵。

VIGS 未引發有幾種解釋，可能病毒有很強的 silencing suppressor 可以抑制 VIGS 發生。Silencing suppressor 主要的機制包括抑制 siRNA 的累積，防礙 siRNA 跟 RISC 結合，或是防礙 RISC 降解 mRNA，使靜默無法產生(Di Serio et al., 2001; Cui and Zhou, 2005)。然而 TRV 的 silencing suppressor 為一較弱之 suppressor (Ratcliff et al., 1999)，且若 TRV 的 silencing suppressor 抑制 VIGS 的效力在大岩桐比煙草強，使大岩桐無法看到靜默，則大岩桐所偵測到的 TRV 量應該比煙草要高，但就實驗結果來看並無發現此種情形。

另一種可能則是病毒感染植物的能力，包括複製或系統性移動的效果不好，使無法累積足夠的病毒量引發並持續 VIGS (Dr. 陳仁治, personal communication)。本研究雖可用 RT-PCR 在系統葉偵測到 TRV 病毒，但病毒量較煙草來得少(可用 quantitative real-time PCR 或是 ELISA 進一步確認)。前人曾有大岩

桐無法被 TRV 感染的報導(Brunt, 1996)，其判定感染與否的方法主要為觀察病徵 (Noordam, 1956)，或是用顯微鏡觀察有無病毒顆粒，雖不能依此判定 TRV 不能感染大岩桐，但顯示 TRV 對大岩桐的感染能力可能並沒有很好。綜合這些資料，雖無法完全證明 VIGS 未引發是由於 TRV 的量太少所造成的，但會是一個蠻有可能的解釋。

引人好奇的是，大岩桐在 TRV 接種 40 天後偵測第三對系統葉的病毒量比起接種約兩週後第一對系統葉的病毒量下降了許多。一種情況是 TRV 雖可在接種兩週後移動到第一對系統葉，但無法繼續移動到第三對系統葉，表示病毒系統性移動的效率不佳；另一種情況是大岩桐有對抗 TRV 的機制，如 RNAi silencing，或是有其他 resistant gene 作用，或是使病毒複製的效率不佳。這可藉由接種 40 天後偵測第一對系統葉的病毒量來驗證，若第一對系統葉仍可偵測到病毒，則較有可能是病毒系統性移動的效率不佳；若第一對系統葉也無法偵測到病毒，則可能是後一種情況。這個實驗可以作為 TRV 對大岩桐的感染效力不好可能機制的參考。

CymMV 有可能成功在大岩桐引發 VIGS，但沒有產生白化性狀

CymMV 的宿主主要為蘭科植物，因此雙子葉植物的大岩桐是否能被很好的感染尚未知。本研究中，被 CymMV 接種的大岩桐，只有極少數個體可在第一次 PCR 增幅出 CymMV 的序列。雖然大部份個體可用 nested PCR 增幅出 CymMV 的序列，顯示仍有少許 CymMV 病毒存留在大岩桐中，但病毒量應很低。然而雖然偵測到的病毒量不高，但有 20% 的接種植株其 *PDS* 表現量比起控制組有顯著的下降，顯示可能發生基因靜默，如此則表示 CymMV 可能不需太高的病毒量即可在大岩桐引發基因靜默。*PDS* 表現量有下降的三棵大岩桐，皆無出現任何白化現象。基因表現量下降不一定能造成性狀改變，可能是由於 redundancy (Lu et al., 2003b)，或是此基因只需要轉譯出極少量蛋白質即可有正常性狀表現(Xu et al., 2008)。若要排除上述可能的 redundancy 等效應，可利用 CymMV 靜默其他報導基因如 *ChII* 或 *CHS*

等(Chen et al., 2004; Robertson, 2004)觀察有無性狀改變。如靜默其他基因可觀察到明顯的性狀改變，則應更換報導基因，以方便將來靜默其他基因時可判定植株靜默發生與否。

出乎意料的是 CymMV 無法在煙草引發 *PDS* 靜默。前人研究中 CymMV 在茄科的宿主相當侷限，如辣椒等常見作物便非其宿主(Brunt, 1996)，只有曼陀羅花曾被報導為 CymMV 之宿主(Navalinskiene et al., 2005)，因此 CymMV 亦無法保證可很好的感染煙草。本研究中在接種煙草上偵測到的 CymMV 量起伏很大，用帶 CymMV 的蘭花汁液接種的部份煙草植株可看到病徵，也可用 RT-PCR 明顯偵測到；但胞外轉錄 pCymMV *SsPDS* 接種的煙草植株卻必須用 nested RT-PCR 才可偵測到 CymMV，這有可能是由於胞外轉錄出的 RNA 感染效力不好，後續將會提到。因此病毒累積量不足可能是該批煙草沒有產生 VIGS 的原因。另外同一個基因鑲嵌入在不同病毒載體上所引發的靜默效果及性狀也有可能不同(Ratcliff et al., 2001)，因此雖然 TRV *SsPDS* 可在煙草引發強烈的基因靜默效果，但 CymMV *SsPDS* 在煙草不一定能引發同樣程度的 *PDS* 靜默效果。為了避免掉胞外轉錄及插入序列可能造成的效應，將來可用 *in vivo* 方法製備 CymMV *SsPDS* 及 CymMV *NbPDS* 接種煙草來驗證 CymMV 能否在煙草引發 VIGS。

除此之外，在本研究中我們使用兩種方法來製備 CymMV 的病毒。一種是 *in vivo* 方法，也就是先將病毒感染到媒介植物如煙草或蝴蝶蘭，研磨得到病毒液後再感染目標植物，另一種是用胞外轉錄得到的病毒 RNA 進行機械感染。結果顯示，不管在大岩桐或是煙草上，用 *in vivo* 方法都比用胞外轉錄得到的病毒感染效果好。此結果跟 TRV 感染煙草和阿拉伯芥的結果相同(Lu et al., 2003b)。這有兩個可能的原因：第一是 *in vivo* 方法所得到的病毒量可能較胞外轉錄得到的病毒量高，因病毒可以在媒介植物有效的增殖，使我們可得到病毒濃度相當高的接種液(Lu et al., 2003b)。另一種可能的原因是用 *in vivo* 方法得到的病毒為完整的病毒顆粒，而胞外轉錄出來的是裸露的 RNA。由於完整的病毒顆粒包括能保護病毒的外鞘蛋白

(coat protein)，因此應較能保護病毒基因體在開始複製之前就被植物或在環境中被分解，同時外鞘蛋白上可能也有一些受體可跟植物體作用幫助病毒感染。

若欲用 TRV 和 CymMV 系統研究大岩桐花部基因功能需考慮花梗接種

雖然 TRV 及 CymMV 在接種大岩桐二到三個禮拜後皆可在系統葉上用 RT-PCR 偵測到病毒，但是在接種大岩桐 40 天後，取最上位葉便幾乎偵測不到這兩種病毒，顯示這兩種病毒在大岩桐體內的繁殖曲線最慢在接種後一個半月就會有顯著的下降。更精確的繁殖曲線必須再做進一步研究方可知道，然而大岩桐從我們接種的時期到開花至少還需要兩個月的時間，也就是說 TRV 及 CymMV 皆無法存活到大岩桐開花的時期，靜默效果很可能也無法持續到開花。本研究的原始目的是為了研究大岩桐花不對稱的基因，因此系統的靜默效果至少要持續到花朵形成，故由此看來，TRV 及 CymMV 皆不適合用來研究大岩桐花不對稱基因的功能。在大岩桐開花前把病毒接種在花梗上或許是可試的方法，如蝴蝶蘭等生長緩慢的植株在靜默花部表現基因時曾採取此種策略(Lu et al., 2007)。但通常植株越成熟越不容易被病毒或農桿菌感染(Burch-Smith et al., 2006; Gould and Kramer, 2007)，因植株抵抗病毒的能力變強。故若到開花前才接種，TRV 及 CymMV 的感染率可能會更降低，而無法有效引發基因靜默。

農桿菌接種並非適合大岩桐 VIGS 系統的接種方式

農桿菌因其對雙子葉植物的高感染力，藉由農桿菌輔助接種被認為可有效提高病毒對非天然宿主植物感染及引發 VIGS 的效率(Lu et al., 2003b)。然而由實驗結果我們認為農桿菌接種並非適合大岩桐 VIGS 系統的接種方式。

用不同品系農桿菌測試 GUS assay 的結果，GV2260 明顯比其他的品系對大岩桐有更好的感染能力，包括感染率及染色的程度。GV2260 為 C58 染色體背景的農桿菌品系，其他同樣為 C58 背景品系的品系包括 GV3101 及 C58C1 (Li et al., 1992;

Rotino et al., 1992)。從結果看來具有 C58 染色體背景的農桿菌品系普遍具有較高的平均轉殖率。其他品系如 LBA4404 為 Ach5 染色體背景，EHA105 為 A281 染色體背景(Li et al., 1992; Rotino et al., 1992)，其平均轉殖率皆較低(但 EHA105 並無接種”Tigrina”的資料)，顯示染色體背景可能跟農桿菌對大岩桐的感染力有一定的關聯。

將 acetosyringone 添加在接種液中亦被認為是提高對農桿菌感染不佳的物種轉殖成功率的關鍵(Chang and Chan, 1991; Chan et al., 1992)。本研究結果顯示未加 acetosyringone 的確無法造成農桿菌感染，而 acetosyringone 濃度大於 600 μ M 也無法造成感染，不過取樣數較少尚需進一步求證。當 acetosyringone 濃度為 200 μ M 時的平均感染率最高，不過跟 400 μ M 的處理相比並無顯著差異。此結果跟農桿菌轉殖苦苣苔科植物非洲堇的優化結果符合(Kushikawa et al., 2002)，顯示 acetosyringone 濃度為 200 μ M 時可能為適合農桿菌接種苦苣苔科植物的條件。

總結農桿菌暫時性表現分析的結果，我們認為 GV2260 及 acetosyringone 濃度為 200 μ M 為最佳的處理組合，作為後續實驗接種的條件。然而此處理組合其成功表現 GUS 的機率仍不到 10%，且表現極不穩定，在多次的試驗中常出現感染率為零的情況，這顯示農桿菌感染大岩桐的效率並不高，可能無法有效率的將病毒載體媒介入大岩桐植株。由農桿菌攜帶 TRV 載體接種的結果顯示，農桿菌的低感染率的確大幅降低了病毒感染大岩桐的效率。原本用 TRV 直接接種大岩桐雖然量不多但是仍可偵測到病毒，但經由農桿菌媒介後則完全偵測不到病毒。

前人曾用農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)接種植物後有無根瘤生長判定農桿菌對許多唇形目的物種感染力都不佳，而苦苣苔科裡只有 *Kohleria*、*Episcia*、*Pereskia* 三個屬的物種可被農桿菌感染，其他包括 *Chirita* (雙心皮草屬)、*Saintpaulia* (非洲堇屬)、*Sinningia* (大岩桐屬)及 *Tussacia* 皆無法被感染(De Cleene and De Ley, 1976)，本研究及實驗室前人在非洲堇研究的結果(Kuo, 2008)符合其假設。然而近年一些利用農桿菌對苦苣苔科進行 GUS assay 測試的研究，多有不錯的成功率。如

Ramonda myconi 有 21.4 % 的成功率(Toth et al., 2006)，非州堇(*Saintpaulia ionantha*) 的成功率甚至超過 60 % (Mercuri et al., 2000; Kushikawa et al., 2002)，大岩桐亦有報導過最高達 31.1 % 的成功率(Zhang et al., 2008)。但這些 GUS assay 的研究多是為了測試轉殖前置步驟的條件，因此皆經過許多可提高轉殖效率的前處理，如共培養在含生長激素的培養基數天(Geier and Sangwan, 1996)，且最終浸泡在農桿菌菌液中至少 30 分鐘。但我們的實驗操作並不會加上這些前處理，因此 GUS assay 的成功率便可能不能像這些研究這麼高，故這些 GUS assay 的研究並無法作為農桿菌接種是否適合用在大岩桐之 VIGS 的證明。



第五章、未來展望

對影響病毒及農桿菌感染效率的其他因子進行優化

在本研究中，TRV 可能由於感染效率不佳而無法引發 VIGS；CymMV 雖可能可引發 VIGS，但成功的比例僅有 20%，且亦無造成白化；農桿菌則是對感染大岩桐及引發的 VIGS 的效果皆不佳。因此包括病毒及農桿菌的感染皆仍有優化的空間。本研究有系統性測試的因子包括病毒種類、病毒製備的方法、農桿菌品系、acetosyringone 濃度等，但是仍有其他因子會影響病毒或農桿菌感染的效率，以下將對我們認為未來可進行優化的因子進行探討。

病原對植物的接種方法為影響病毒或是農桿菌能否在植物體內累積，並因此影響 VIGS 效率的重要關鍵(Xu et al., 2008)。曾經報導過的農桿菌的接種方法包括針筒加壓法、真空注射法、噴灑法、機械接種、灌根(agroinoculation)、floral dipping 等(Liu et al., 2002a; Burch-Smith et al., 2004; Ryu et al., 2004; Gould and Kramer, 2007)。因不同植物的組織質地不同，這些方法可能藉由影響菌液滲透組織的程度，或是對組織造成的傷害程度不同，傷害可能會影響植物細胞存活或是刺激細胞產生次級代謝物如 acetosyringone，來影響 VIGS 的效率(Liu et al., 2002a; Gould and Kramer, 2007)。病毒的接種以機械接種居多，但譬如將病毒液用針筒注射進植物組織、或是用噴灑的方式，應該也是可行的，也可能會有效率上的不同，但目前無文獻探討。本研究使用針筒加壓法注射農桿菌，以機械法接種病毒，但目前所用的不一定是最適合大岩桐的接種方法，因此使用其他的接種方法或許可以得到更好的感染效率。本研究曾利用真空加壓法將農桿菌接種大岩桐，但大岩桐為肉質葉，且葉上密覆毛，因此菌液不容易藉由真空加壓進入薄壁組織，感染效率也不好(data not shown)，但其他的接種方法仍可以嘗試。在某些例子中，接種子葉比真葉能更有效的引發系統性靜默(Ho et al., 2009)，這也是可以考慮的方法。除此之外，現有的接種方法也可以嘗試調整。例如針筒加壓法，當注射時所施加的壓力

不同，也有可能影響菌液滲透的效果及組織受傷的程度，進而影響感染的效率。本研究曾測試施加不同壓力下感染的情形，結果發現當施加壓力過大時，大岩桐葉片易出現葉萎凋的現象(圖三十四)，造成感染效率降低；但是在不使其萎凋的壓力範圍下，注射壓力較大又比注射壓力較小的感染效果來得好(data not shown)。因此找尋合適的注射壓力也是可以優化的方向之一。



圖三十四、被加壓注射農桿菌後接種葉萎凋的大岩桐。

除了接種方法之外，其他因子諸如接種植物時期(Gould and Kramer, 2007)、接種農桿菌濃度(Wang et al., 2006; Bhaskar et al., 2009)、植物品系(Burch-Smith et al., 2004)(Porter, 1991)等因子也曾有報導可能對農桿菌感染及 VIGS 的效率有關。我們曾比較過在大岩桐長出第三對、第四對及第五對葉的三種不同時期接種農桿菌，以及用 OD₆₀₀ 為 10、2、0.7 的三種不同農桿菌濃度接種，但都沒有明顯差異(data not shown)。唯一有差別的因子是植物品系。

以農桿菌 GV2260 的接種為例，在 acetosyringone 濃度為 200 μ M 下共接種了 55 片”Tigrina”葉片，共有 4 片有 GUS 訊號；接種了 32 片”Carangola X peloria”葉片，有一片得到 GUS 訊號。接種了 55 片”AVANTI”葉片，卻沒有任何葉片有得到 GUS 訊號，這顯示農桿菌對”Tigrina”的感染力可能比”AVANTI”或”Carangola X peloria 來得高。CymMV 的接種結果亦顯示 CymMV 對”Tigrina”的感染力

比”AVANTI”及”Carangola X peloria”要來得好。此結果顯示病毒及農桿菌對不同大岩桐品系都可能有感染效果上的差異。因此未來可增加測試的大岩桐品系，以找出最適合的實驗材料。

建立新的 VIGS 病毒載體

本研究所用的兩種病毒系統皆無法有效的在大岩桐上引發VIGS，究其原因可能都跟病毒對植株的感染效率不佳有關，因此從原本已知可感染大岩桐的病毒建立新的VIGS載體是個可以考慮的想法。目前曾被報導可以感染大岩桐的病毒包括 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)、*Tomato ringspot virus* (ToRSV)、*Dahlia ringspot virus* (syn: *Tobacco streak virus* (Asjes et al., 1996)) (Zettler and Nagel, 1983)、*Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (Daughtrey et al., 1997)、*Belladonna mottle virus*、*Dulcamara mottle virus*，以及 *Tobacco necrosis virus* (Brunt, 1996)。這些病毒中 TSWV、ToRSV 及 INSV 皆為 *Tospovirus* 屬的病毒，顯示此屬病毒對大岩桐可能有相當不錯的感染力，或可選擇其一建立 VIGS 載體。其中的 TSWV 對建立應用在大岩桐上的 VIGS 載體時有許多好處：首先 TSWV 可感染包括大岩桐在內的多種苦苣苔科植物(Cho et al., 1987; Brunt, 1996)；將 TSWV 的 N 基因轉殖入煙草可引發 PTGS 抗病，顯示 TSWV 應可引發 VIGS。除此之外，臺灣也有人蒐集大岩桐的 TSWV 病毒株(張清安 et al., 1997)可作為選擇無病徵 clone 的來源。然而 *Tospovirus* 皆為 ssRNA(-)病毒，因 RNA 進入植物後無法直接轉錄出病毒複製所需的 RdRP 等酵素，因此用 ssRNA(-)病毒的載體在植物體內表現仍有技術上的困難。若未來在 ssRNA(-)病毒載體的表現方法上有所突破，如將病毒所需之 RdRP 等基因轉殖到植物內，則 TSWV 等 *Tospovirus* 屬的病毒將可考慮(Dr. 張雅君, personal communication)。其他可感染大岩桐但非 *Tospovirus* 屬的病毒研究皆較少，且尚無已知的病毒 clone 來源，因此要從中建立 VIGS 的載體也有其困難性。

除了從可自然感染大岩桐的病毒建立 VIGS 載體之外，另一種方法是馴化既有

的病毒。如本研究測試的TRV及CymMV，雖然其對大岩桐的感染效率不高，但由於病毒的演化速率很快，只要幾個胺基酸突變即可以改變宿主的範圍(Cheng-Mayer et al., 1991)。因此若將TRV及CymMV重覆接種大岩桐數代，便可能得到能適應大岩桐環境的clone。接著將此感染力高的病毒clone重新純化做成載體，即可用此載體嘗試在大岩桐引發VIGS。



第六章、參考資料

- Asjes CJ, Blom-Barnhoorn GJ, Piron PGM, Harrewijn P, van Oosten AM (1996)**
Control review of air-borne tulip breaking virus and lily symptomless virus in *Lilium* in the Netherlands. *Acta Horticulturae* **432**: 290-296
- Bartels PG, Watson CW (1978)** Inhibition of carotenoid synthesis by fluridone and norflurazon. *Weed Science* **26**: 198-203
- Barth S, Geier T, Eimert K, Watillon B, Sangwan RS, Gleissberg S (2009)** *KNOX* overexpression in transgenic *Kohleria* (Gesneriaceae) prolongs the activity of proximal leaf blastozones and drastically alters segment fate. *Planta* **230**: 1081-1091
- Baulcombe DC (1999)** Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 109-113
- Becker A, Lange M (2010)** VIGS - genomics goes functional. *Trends in Plant Science* **15**: 1-4
- Bhaskar PB, Venkateshwaran M, Wu L, Ane JM, Jiang JM (2009)** *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing: a rapid tool for functional gene assay in potato. *Plos One* **4**: e5812
- Bolton GW, Nester EW, Gordon MP (1986)** Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* **232**: 983-985
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ (1996)** Plant viruses online: descriptions and lists from the VIDE database. Version: 20th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Bruun-Rasmussen M, Madsen CT, Jessing S, Albrechtsen M (2007)** Stability of

Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1323-1331

Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP (2004) Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant Journal* **39**: 734-746

Burch-Smith TM, Schiff M, Liu YL, Dinesh-Kumar SP (2006) Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142**: 21-27

Cai X, Wang C, Xu Y, Xu Q, Zheng Z, Zhou X (2007) Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. *Virus Research* **125**: 169-175

Cai XZ, Xu QF, Wang CC, Zheng Z (2006) Development of a virus-induced gene-silencing system for functional analysis of the *RPS2*-dependent resistance signalling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **62**: 223-232

Chan MT, Lee TM, Chang HH (1992) Transformation of indica rice (*Oryza Sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant and Cell Physiology* **33**: 577-583

Chang HH, Chan MT (1991) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* L. Merr.) is promoted by the inclusion of potato suspension culture. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **32**: 171-178

Chang JY (2009a) Study of inflorescence identity and floral determinacy genes on inflorescence transition in *Titanotrichum*. Master Thesis, National Taiwan University, Taipei. 122 p.

Chang YC (2009b) The role of floral symmetry genes on actinomorphic reversion in domesticated *Saintpaulia ionantha*. Master Thesis, National Taiwan University, Taipei. 99 p.

Chautems A, Baracho GS, Siqueira JA (2000) A new species of *Sinningia* (Gesneriaceae) from northeastern Brazil. *Brittonia* **52**: 49-53

- Chen JC, Jiang CZ, Gookin TE, Hunter DA, Clark DG, Reid MS** (2004) Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Molecular Biology* **55**: 521-530
- Cheng-Mayer C, Shioda T, Levy JA** (1991) Host range, replicative, and cytopathic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by very few amino acid changes in *tat* and gp120. *Journal of Virology* **65**: 6931-6941
- Cho JJ, Mau RFL, Mitchell WC, Gonsalves D, Yudin LS** (1987) Host list of plants susceptible to tomato spotted wilt virus (TSWV). Research Extension Series, Honolulu: University of Hawaii.
- Citerne H, Cronk QCB** (1999) The origin of the peloric *Sinningia*. *The New Plantsman* **6**: 219-222
- Citerne HL, Moller M, Cronk QCB** (2000) Diversity of *cycloidea*-like genes in Gesneriaceae in relation to floral symmetry. *Annals of Botany* **86**: 167-176
- Constantin GD, Krath BN, MacFarlane SA, Nicolaisen M, Johansen IE, Lund OS** (2004) Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant Journal* **40**: 622-631
- Cooper JI, Harrison BD** (1973) Role of weed hosts and distribution and activity of vector nematodes in ecology of tobacco rattle virus. *Annals of Applied Biology* **73**: 53-66
- Cui XF, Zhou XP** (2005) Viral suppressor of RNA silencing. *Progress in Biochemistry and Biophysics* **32**: 210-216
- Daughtrey ML, Jones RK, Moyer JW, Daub ME, Baker JR** (1997) Tospoviruses strike the greenhouse industry: INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Disease* **81**: 1220-1230
- De Cleene M, De Ley J** (1976) The host range of crown gall. *The Botanical Review* **42**: 389-466

- Demmigadams B, Adams WW** (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 599-626
- Di Serio F, Schob H, Iglesias A, Tarina C, Boulidoires E, Meins F** (2001) Sense- and antisense-mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressors and is associated with accumulation of small RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6506-6510
- Endress PK** (1999) Symmetry in flowers: diversity and evolution. *International Journal of Plant Sciences* **160**: S3-S23
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811
- Geier T, Sangwan RS** (1996) Histology and chimera segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria* internode explants. *Plant Cell Reports* **15**: 386-390
- Godge MR, Purkayastha A, Dasgupta I, Kumar PP** (2008) Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Reports* **27**: 209-219
- Godwin I, Todd G, Fordlloyd B, Newbury HJ** (1991) The Effects of Acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-Mediated Transformation Vary According to Plant-Species. *Plant Cell Reports* **9**: 671-675
- Gould B, Kramer EM** (2007) Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant Methods* **3**: 6

- Hamilton AJ, Baulcombe DC** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952
- Hansen G, Das A, Chilton MD** (1994) Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 7603-7607
- Hileman LC, Drea S, de Martino G, Litt A, Irish VF** (2005) Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *Plant Journal* **44**: 334-341
- Ho FI, Chen YY, Lin YM, Cheng CP, Wang JF** (2009) A tobacco rattle virus-induced gene silencing system for a soil-borne vascular pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Botanical Studies* **50**: 413-424
- Holzberg S, Brosio P, Gross C, Pogue GP** (2002) Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant Journal* **30**: 315-327
- Hsu HC, Cronk QCB, Wang CN** (2009) Inheritance and molecular genetics of floral symmetry in Darwin's Gloxinia peloria (*Sinningia speciosa*). *Mechanisms of Development* **126**: S251-S251
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo Journal* **6**: 3901-3907
- Kalantidis K, Schumacher HT, Alexiadis T, Helm JM** (2008) RNA silencing movement in plants. *Biology of the Cell* **100**: 13-26
- Kumagai MH, Donson J, Dellacioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK** (1995) Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 1679-1683

- Kuo YW** (2008) Establishing virus induced gene silence technique in Africa violet (Gesneriaceae). Master Thesis, National Taiwan University, Taipei. 43p.
- Kushikawa S, Hoshino Y, Mii M** (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Plant Science **161**: 953-960
- Kushikawa S, Miyoshi K, Mii M** (2002) Pre-culture treatment enhances transient GUS gene expression in leaf segment of *Saintpaulia ionantha* Wendl. after inoculation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnology **19**: 149-152
- Lee HS, Kim SW, Lee KW, Eriksson T, Liu JR** (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of ginseng (*Panax ginseng*) and mitotic stability of the inserted beta-glucuronidase gene in regenerants from isolated protoplasts. Plant Cell Reports **14**: 545-549
- Li XQ, Liu CN, Ritchie SW, Peng JY, Gelvin SB, Hodges TK** (1992) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *gusA* in rice. Plant Molecular Biology **20**: 1037-1048
- Lindbo JA, Silvarosales L, Proebsting WM, Dougherty WG** (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants implications for regulation of gene expression and virus-resistance. Plant Cell **5**: 1749-1759
- Liu EW, Page JE** (2008) Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. Plant Methods **4**: 5
- Liu Y, Nakayama N, Schiff M, Litt A, Irish VF, Dinesh-Kumar SP** (2004) Virus induced gene silencing of a *DEFICIENS* ortholog in *Nicotiana benthamiana*. Plant Molecular Biology **54**: 701-711
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP** (2002a) Virus-induced gene silencing in tomato. Plant Journal **31**: 777-786
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP** (2002b) Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPRI/NIMI* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic

virus. *Plant Journal* **30**: 415-429

Lu HC, Chen HH, Tsai WC, Chen WH, Su HJ, Chang DCN, Yeh HH (2007)

Strategies for functional validation of genes involved in reproductive stages of orchids. *Plant Physiology* **143**: 558-569

Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu AJ, Rathjen JP, Bendahmane A,

Day L, Baulcombe DC (2003a) High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO Journal* **22**: 5690-5699

Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC (2003b)

Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* **30**: 296-303

Martin IV, MacNeill SA (2004) Functional analysis of subcellular localization and

protein-protein interaction sequences in the essential DNA ligase I protein of fission yeast. *Nucleic Acids Research* **32**: 632-642

McKinney HH (1929) Mosaic diseases in the Canary Islands, west Africa, and

Gibraltar. *Journal of Agricultural Research* **39**: 557-578

Mercuri A, De Benedetti L, Burchi G, Schiva T (2000) *Agrobacterium*-mediated

transformation of African violet. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **60**: 39-46

Mlotshwa S, Voinnet O, Mette MF, Matzke M, Vaucheret H, Ding SW, Pruss G,

Vance VB (2002) RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* **14**: S289-S301

Moller M, Pfosser M, Jang CG, Mayer V, Clark A, Hollingsworth ML, Barfuss

MHJ, Wang YZ, Kiehn M, Weber A (2009) A preliminary phylogeny of the 'didymocarpoid Gesneriaceae' based on three molecular data sets: incongruence with available tribal classifications. *American Journal of Botany* **96**: 989-1010

Nagamatsu A, Masuta C, Senda M, Matsuura H, Kasai A, Hong S, Kitamura K,

Abe J, Kanazawa A (2007) Functional analysis of soybean genes involved in

- flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnology Journal* **5**: 778-790
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R** (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* **2**: 279-289
- Navalinskiene M, Raugalas J, Samuitiene M** (2005) Viral diseases of flower plants. Identification of viruses affecting orchids (*Cymbidium* Sw.). *Biologija* **2**: 29-34
- Nishii K, Nagata T** (2007) Developmental analyses of the phyllomorph formation in the rosulate species *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae). *Plant Systematics and Evolution* **265**: 135-145
- Noordam D** (1956) Host and test plants of tobacco rattle virus. *Netherland Journal of Plant Pathology* **62** 219–225
- Ober ES, Sharp RE** (1994) Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiology* **105**: 981-987
- Porter JR** (1991) Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**: 387-421
- Preston JC, Hileman LC** (2010) SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN 1 initiates flowering in *Antirrhinum majus* through the activation of meristem identity genes. *Plant Journal* **62**: 704-712
- Rao MVR, Rao GJN** (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice under Acetosyringone-free conditions. *Plant Biotechnology* **24**: 507–511
- Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC** (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**: 1558-1560
- Ratcliff F, MacFarlane SA, Baulcombe DC** (1999) Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**: 1207-1215

- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC** (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal* **25**: 237-245
- Robertson D** (2004) VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 495-519
- Rotino GL, Perrone D, Ajmonemarsan P, Lupotto E** (1992) Transformation of *Solanum integrifolium* Poir via *Agrobacterium tumefaciens*: Plant regeneration and progeny analysis. *Plant Cell Reports* **11**: 11-15
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC** (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**: 937-946
- Ryu CM, Anand A, Kang L, Mysore KS** (2004) Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species. *Plant Journal* **40**: 322-331
- Shivprasad S, Pogue GP, Lewandowski DJ, Hidalgo J, Donson J, Grill LK, Dawson WO** (1999) Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology* **255**: 312-323
- Thomas CL, Jones L, Baulcombe DC, Maule AJ** (2001) Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J* **25**: 417-425
- Toth S, Kiss C, Scott P, Kovacs G, Sorvari S, Toldi O** (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the desiccation tolerant resurrection plant *Ramonda myconi* (L.) Rchb. *Plant Cell Reports* **25**: 442-449
- Vanderkrol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR** (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**: 291-299
- vanKammen A** (1997) Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science* **2**: 409-411

- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC** (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**: 157-167
- Wang CC, Cai XZ, Wang XM, Zheng Z** (2006) Optimisation of tobacco rattle virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biology* **33**: 347-355
- Wang CN, Cronk QCB** (2003) Meristem fate and bulbil formation in *Titanotrichum* (Gesneriaceae). *American Journal of Botany* **90**: 1696-1707
- Wang XG, Zhu HL, Shao Y, Chen AJ, Ma YZ, Luo YB, Zhu BZ** (2010) Analysis of gene functions by a syringe infiltration method of VIGS. *Russian Journal of Plant Physiology* **57**: 590-597
- Weber A, Skog LE** (2007) The genera of Gesneriaceae. Basic information with illustration of selected species, 2nd ed. <http://www.genera-gesneriaceae.at>
- Wege S, Scholz A, Gleissberg S, Becker A** (2007) Highly efficient virus-induced gene silencing (VIGS) in california poppy (*Eschscholzia californica*): An evaluation of VIGS as a strategy to obtain functional data from non-model plants. *Annals of Botany* **100**: 641-649
- Weigel D, Glazebrook J** (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press). pp.125-126
- Wong SM, Mahtani PH, Lee KC, Yu HH, Tan Y, Neo KK, Chan Y, Wu M, Chng CG** (1997) Cymbidium mosaic potexvirus RNA: Complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *Archives of Virology* **142**: 383-391
- Xu YP, Xu QF, Song XY, Zhang ZX, Cai XZ** (2008) Virus-induced gene silencing. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)* **34**: 119-131
- Zettler FW, Nagel J** (1983) Infection of cultivated gesneriads by 2 strains of tobacco mosaic virus. *Plant Disease* **67**: 1123-1125
- Zhang MZ, Ye D, Wang LL, Pang JL, Zhang YH, Zheng K, Bian HW, Han N, Pan**

JW, Wang JH, Zhu MY (2008) Overexpression of the cucumber *LEAFY* homolog *CFL* and hormone treatments alter flower development in gloxinia (*Sinningia speciosa*). *Plant Molecular Biology* **67**: 419-427

張清安, 陳金枝, 江芬蘭, 趙佳鴻, 陳慶忠, 葉錫東 (1997) 一種感染大岩桐之番茄斑萎病毒之鑑定與抗血清製備。 *植保會刊* **39**: 396-397



第七章、附錄

附錄一、本研究所使用的引子列表。

| Primer | Sequence (5'-3') | Region | Reference | Used for |
|------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|---------------------------------|
| pYL156F | GGTCAAGGTACGTAGTAGAG | TRV2 | (Hileman et al., 2005) | RT-PCR |
| pYL156R | CGAGAATGTCAATCTCGTAGG | TRV2 | (Hileman et al., 2005) | RT及RT-PCR |
| TRV1-F | CTTGAAGAAGAAGACTTTCGAAGTCTC | TRV1 | (Hileman et al., 2005) | RT-PCR |
| TRV1-R | GTAAAATCATTGATAACAACACAGACAAAAC | TRV1 | (Hileman et al., 2005) | RT及RT-PCR |
| CymMV CP-F | GAAATAATCATGGGAGAGCC | CymMV | (Lu et al., 2007) | RT-PCR |
| CymMV CP-R | AGTTTGGCGTTATTCAGTAGG | CymMV | (Lu et al., 2007) | RT及RT-PCR |
| CymMV IN-F | TATCTACTAAGTCCCGATCCT | CymMV | 本研究 | RT-PCR |
| CymMV IN-R | CAGGTCGGCTAACTTGGGTG | CymMV | 本研究 | RT-PCR |
| GUS-F | GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG | GUS | (Lee et al., 1995) | Colony PCR |
| GUS-R | GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA | GUS | (Lee et al., 1995) | Colony PCR |
| GFP-F | ATGAGTAAAGGAGAAGAACT | GFP | (Martin and MacNeill, 2004) | RT-PCR |
| GFP-R | TTATTTGTATAGTTCATCCA | GFP | (Martin and MacNeill, 2004) | RT-PCR |
| tuba-F | AGGTCGGAAATGCWTGCTGGGA | <i>Tubulin</i> | (Chang, 2009a) | RT-PCR |
| tuba-R | AACTCTCCTTCCTCCATACCCTCACC | <i>Tubulin</i> | (Chang, 2009a) | RT-PCR |
| PDSYu-F | GATTTYTKCAGGAGAARCATGG | <i>PDS</i> | (Kuo, 2008) | 增幅 <i>PDS</i> ₂₇₉ 片段 |
| PDSYu-R | KGAARTATGGVATCTCTTCCA | <i>PDS</i> | (Kuo, 2008) | 增幅 <i>PDS</i> ₂₇₉ 片段 |
| PDSHa-F | AAGGTAGCTGCATGGAAAGATGA | <i>PDS</i> | 本研究 | RT-PCR |
| PDSHb-R | GACAGCACCTTCCATTGAAGC | <i>PDS</i> | 本研究 | RT-PCR |
| PDSHc-F | ACAATGAAATGCTTACTTGGC | <i>PDS</i> | 本研究 | 增幅 <i>PDS</i> ₈₄₃ 片段 |
| PDSHd-R | GAGTTTTGACAACATGGTACTTC | <i>PDS</i> | 本研究 | 增幅 <i>PDS</i> ₈₄₃ 片段 |
| poly T18 | TTTTTTTTTTTTTTTTTT | | | RT |

附錄二、pTRV1 全長序列(共 6791 bp)。粗斜體底線處為引子 TRV1-F 及 TRV1-R 的位置。

ATAAAACATTTCAATCCTTTGAACGCGGTAGAACGTGCTAATTGGATTTTGGT
GAGAACGCGGTAGAACGTACTTATCACCTACAGTTTTATTTTGTTTTTCTTTTT
GGTTTAATCTATCCAGCTTAGTACCGAGTGGGGGAAAGTGACTGGTGTGCCT
AAAACCTTTTCTTTGATACTTTGTAAAATACATACAGATACAATGGCGAACG
GTAACCTCAAGTTGTCTCAATTGCTCAATGTGGACGAGATGTCTGCTGAGCA
GAGGAGTCATTTCTTTGACTTGATGCTGACTAAACCTGATTGTGAGATCGGGC
AAATGATGCAAAGAGTTGTTGTTGATAAAGTCGATGACATGATTAGAGAAAG
AAAGACTAAAGATCCAGTGATTGTTTCATGAAGTTCTTTCTCAGAAGGAACAG
AACAGTTAATGGAAATTTATCCTGAATTCAATATCGTGTTTAAAGACGACAA
AACATGGTTCATGGGTTTGCGGCTGCTGAGCGAAAACACTACAAGCTTTATTG
CTTTTAGATAGAGTTCCTGCTCTGCAAGAGGTGGATGACATCGGTGGTCAATG
GTCGTTTTGGGTAAGTACTAGAGGTGAGAAAAGGATTCATTCCTGTTGTCCAAAT
CTAGATATTCGGGATGATCAGAGAGAAATTTCTCGACAGATATTTCTTACTGCT
ATTGGTGATCAAGCTAGAAGTGGTAAGAGACAGATGTCCGAGAATGAGCTGT
GGATGTATGACCAATTTTCGTAATAATATTGCTGCGCCTAACGCGGTTAGGTGC
AATAATACATATCACGGTTGTACATGTAGGGGTTTTTCTGATGGTAAGAAGAA
AGGCGCGCAGTATGCGATAGCTCTTCACAGCCTGTATGACTTCAAGTTGAAA
GACTTGATGGCTACTATGGTTGAGAAGAAAACATAAGTGGGTCATGCTGCTA
TGCTTTTTGCTCCTGAAAGTATGTTAGTGGACGAAGGTCCATTACCTTCTGTT
GACGGTTACTACATGAAGAAGAACGGGAAGATCTATTTTCGGTTTTGAGAAAG
ATCCTTCCTTTTCTTACATTCATGACTGGGAAGAGTACAAGAAGTATCTACTG
GGGAAGCCAGTGAGTTACCAAGGGAATGTGTTCTACTTCGAACCGTGCCAG
GTGAGAGGAGACACGATGCTTTTTTCGATCTACAGGATAGCTGGAGTTCCGA
GGAGGTCTCTATCATCGCAAGAGTACTACCGAAGAATATATATCAGTAGATGG
GAAAACATGGTTGTTGTCCAATTTTCGATCTGGTTCGAATCAACGCGAGAGT
TGGTCAAGAAAGACCTGTTTGTAGAGAAACAATTCATGGACAAGTGTTTGGA
TTACATAGCTAGGTTATCTGACCAGCAGCTGACCATAAGCAATGTTAAATCATA
TTTGAGTTCAAATAATTGGGTCTTATTCATAAACGGGGCGGCCGTGAAGAAC
AAGCAAAGTGTAGATTCTCGAGATTTACAGTTGTTGGCTCAAACCTTTGCTAGT
GAAGGAACAAGTGGCGAGACCTGTCATGAGGGAGTTGCGTGAAGCAATTCT
GACTGAGACGAAACCTATCACGTCATTGACTGATGTGCTGGGTTTAAATATCAA
GAAAATGTGGAAGCAGTTTGCTAACAAGATCGCAGTCGGCGGATTCGTTGG
CATGGTTGGTACTCTAATTGGATTCTATCCAAAGAAGGTACTAACCTGGGCGA
AGGACACACCAAATGGTCCAGAACTATGTTACGAGAACTCGCACAAAACCA
AGGTGATAGTATTTCTGAGTGTGTGTATGCCATTGGAGGAATCACGCTTATG

CGTCGAGACATCCGAGATGGACTGGTGAAAAAACTATGTGATATGTTTGATAT
CAAACGGGGGGCCCATGTCTTAGACGTTGAGAATCCGTGCCGCTATTATGATA
TCAACGATTTCTTTAGCAGTCTGTATTCGGCATCTGAGTCCGGTGAGACCGTT
TTACCAGATTTATCCGAGGTAAGCAAGTCTGATAAGTTATTGCAGCAGAA
GAAAGAAATCGCTGACGAGTTTCTAAGTGCAAATTCTCTAACTATTCTGGC
AGTTCGGTGAGAACTTCTCCACCATCGGTGGTTCGGTTCATCTCGAAGCGGAC
TGGGTCTGTTGTTGGAAGACAGTAACGTGCTGACCCAAGCTAGAGTTGGAGT
TTCAAGAAAGGTAGCCGATGAGGAGATCATGGAGCAGTTTCTGAGTGGTCTT
ATTGACACTGAAGCAGAAATTGACGAGGTTGTTCCAGCCTTTTCAGCTGAAT
GTGAAAGAGGGGAAACAAGCGGTACAAAGGTGTTGTGTAACCTTTTAACGC
CACCAGGATTTGAGAACGTGTTGCCAGCTGTCAAACCTTTGGTCAGCAAAG
GAAAAACGGTCAAACGTGTGCTGATTACTTCCAAGTGATGGGAGGTGAGAGATT
ACCAAAAAGGCCGGTTGTCAGTGGAGACGATTCTGTGGACGCTAGAAGAGA
GTTTCTGTACTACTTAGATGCGGAGAGAGTCGCTCAAATGATGAAATTATGT
CTCTGTATCGTGACTATTCGAGAGGAGTTATTCGAACTGGAGGTCAGAATTAC
CCGCACGGACTGGGAGTGTGGGATGTGGAGATGAAGAACTGGTGCATACGT
CCAGTGGTCACTGAACATGCTTATGTGTCCAACCCAGACAAACGTATGGATG
ATTGGTCGGGATACTTAGAAGTGGCTGTTTGGGAACGAGGTATGTTGGTCAA
CGACTTCGCGGTGCAAAGGATGAGTGATTATGTCATAGTTTGCGATCAGACGT
ATCTTTGCAATAACAGGTTGATCCTTGACAATTTAAGTGCCCTGGATCTAGGA
CCAGTTAACTGTTCTTTTGAATTAGTTGACGGTGTACCTGGTTGTGGTAAGTC
GACAATGATTGTCAACTCAGCTAATCCTTGTGTCGATGTGGTTCTCTCTACTG
GGAGAGCAGCAACCGACGACTTGATCGAGAGATTCGCGAGCAAAGGTTTTTC
CATGCAAATTGAAAAGGAGAGTGAAGACGGTTGATTCTTTTTTTGATGCATTG
TGTTGATGGTTCTTTAACCGGAGACGTGTTGCATTCGATGAAGCTCTCATGG
CCCATGCTGGTATGGTGTACTTTTGCCTCAGATAGCTGGTGCTAAACGATGT
ATCTGTCAAGGAGATCAGAATCAAATTTCTTTCAAGCCTAGGGTATCTCAAGT
TGATTTGAGGTTTTCTAGTCTGGTCGGAAAGTTTGACATTGTTACAGAAAAA
AGAGAACTTACAGAAGTCCAGCAGATGTGGCTGCCGTATTGAACAAGTACT
ATACTGGAGATGTCAGAACACATAACGCGACTGCTAATTCGATGACGGTGAG
GAAGATTGTGTCTAAAGAACAGGTTTCTTTGAAGCCTGGTGCTCAGTACATA
ACTTTCCTTCAGTCTGAGAAGAAGGAGTTGGTAAATTTGTTGGCATTGAGGA
AAGTGGCAGCTAAAGTGAGTACAGTACACGAGTCGCAAGGAGAGACATTCA
AAGATGTAGTCTAGTCAGGACGAAACCTACGGATGACTCAATCGCTAGAGG
TCGGGAGTACTTAATCGTGGCGTTGTGCGGTCACACACAATCACTTGTGTATG
AACTGTGAAAGAGGACGATGTAAGCAAAGAGATCAGGGAAAGTGCCGCGC
TTACGAAGGCCGCTTTGGCAAGATTTTTTTGTTACTGAGACCGTCTTATGACGG
TTTCGGTCTAGGTTTGATGTTTTTLAGACATCATGAAGGGCCTTGCGCCGTTCC

AGATTCAGGTACGATTACGGACTTGGAGATGTGGTACGACGCTTTGTTTCCGG
GAAATTCGTTAAGAGACTCAAGCCTAGACGGGTATTTGGTGGCAACGACTGA
TTGCAATTTGCGATTAGACAATGTTACGATCAAAAGTGGAAACTGGAAAGAC
AAGTTTGCTGAAAAAGAAACGTTTCTGAAACCGGTATTTCGTA CTGCTATGC
CTGACAAAAGGAAGACTACTCAGTTGGAGAGTTTGTAGCGTTGCAGAAAA
GGAACCAAGCGGCACCCGATCTACAAGAAAATGTGCACGCAACAGTTCTAAT
CGAAGAGACGATGAAGAAGTTGAAATCTGTTGTCTACGATGTGGGAAAAATT
CGGGCTGATCCTATTGTCAATAGAGCTCAAATGGAGAGATGGTGGAGAAATC
AAAGCACAGCGGTACAGGCTAAGGTAGTAGCAGATGTGAGAGAGTTACATG
AAATAGACTATTCGTCTTACATGTTTATGATCAAATCTGACGTGAAACCTAAG
ACTGATTTAACACCGCAATTTGAATACTCCGCTCTACAGACTGTTGTGTATCA
CGAGAAGTTGATCAACTCGTTGTTTCGGTCCAATTTTCAAAGAAATTAATGAA
CGCAAGTTGGATGCTATGCAACCACATTTTGTGTTCAACACGAGAATGACATC
GAGTGATTTAAACGATCGAGTGAAGTTCTTAAATACGGAAGCGGCTTACGAC
TTTGTGAGATAGACATGTCTAAATTCGACAAGTCGGCAAATCGCTTCCATTT
ACA ACTGCAGCTGGAGATTTACAGGTTATTTGGGCTAGATGAGTGGGCGGCC
TTCCTTTGGGAGGTGTCGCACACTCAA ACTACTGTGAGAGATATTCAAATG
GTATGATGGCGCATATTTGGTACCAACAAAAGAGTGGAGATGCTGATACTTAT
AATGCAAATTCAGATAGA ACACTGTGTGCACTCTTGTCTGAATTACCATTGGA
GAAAGCAGTCATGGTTACATATGGAGGAGATGACTCACTGATTGCGTTTCCTA
GAGGAACGCAGTTTGTGATCCGTGTCCAAAGTTGGCTACTAAGTGGAATTT
CGAGTGCAAGATTTTAAAGTACGATGTCCCAATGTTTTGTGGGAAGTTCTTGC
TTAAGACGTCATCGTGTTACGAGTTCGTGCCAGATCCGGTAAAAGTTCTGAC
GAAGTTGGGGAAAAAGAGTATAAAGGATGTGCAACATTTAGCCGAGATCTAC
ATCTCGCTGAATGATTCCAATAGAGCTCTTGGGAACTACATGGTGGTATCCAA
ACTGTCCGAGTCTGTTTCAGACCGGTATTTGTACAAAGGTGATTCTGTTCATG
CGCTTTGTGCGCTATGGAAGCATATTAAGAGTTTTACAGCTCTGTGTACATTAT
TCCGAGACGAAAACGATAAGGAATTGAACCCGGCTAAGGTTGATTGGAAGA
AGGCACAGAGAGCTGTGTCAA ACTTTTACGACTGGTAATATGGAAGACAAGT
CATTGGTCACCTTGAAGAAGAAGACTTTCGAAGTCTC(TRV1-F)AAAATTCTCA
AATCTAGGGGCCATTGAATTGTTTGTGGACGGTAGGAGGAAGAGACCGAAGT
ATTTTCACAGAAGAAGAGAACTGTCCCTAAATCATGTTGGTGGGAAGAAGA
GTGAACACAAGTTAGACGTTTTTTGACCAAAGGGATTACAAAATGATTAAATC
TTACGCGTTTCTAAAGATAGTAGGTGTACA ACTAGTTGTAACATCACATCTAC
CTGCAGATACGCCTGGGTTCAATCAAATCGATCTGTTGGATTTCGAGACTTACT
GAGAAAAGAAAGAGAGGAAAGACTATTCAGAGATTCAAAGCTCGAGCTTGC
GATAACTGTTTCAGTTGCGCAGTACAAGGTTGAATACAGTATTTCCACACAGG
AGAACGTACTTGATGTCTGGAAGGTGGGTTGTATTTCTGAGGGCGTTCCGGT

CTGTGACGGTACATAACCCTTTCAGTATCGAAGTGTGCGCTAATATGGGTTGCTA
CTGATTCGACTAGGCGCCTCAATGTGGAAGAACTGAACAGTTCGGATTACAT
TGAAGGCGATTTTACCGATCAAGAGGTTTTTCGGTGAGTTCATGTCTTTGAAAC
AAGTGGAGATGAAGACGATTGAGGCGAAGTACGATGGTCCTTACAGACCAG
CTACTACTAGACCTAAGTCATTATTGTCAAGTGAAGATGTTAAGAGAGCGTCT
AATAAGAAAACTCGTCTTAATGCATAAAGAAATTTATTGTCAATATGACGTG
TGTA CTCAAGGGTTGTGTGAATGAAGTCACTGTTCTTGGTCACGAGACGTGT
AGTATCGGTCATGCTAACAAATTGCGAAAGCAAGTTGCTGACATGGTTGGTG
TCACACGTAGGTGTGCGGAAAATAATTGTGGATG**GTTTGTCTGTGTTGTTATC**
AATGATTTAC(TRV1-R)TTTTGATGTGTATAATTGTTGTGGCCGTAGTCACCTT
GAAAAGTGTGCTAAACGTGTTGAAACAAGAAATCGAGAAATTTGGAAACAA
ATTCGACGAAATCAAGCTGAAAACATGTCTGCGACAGCTAAAAAGTCTCATA
ATTCGAAGACCTCTAAGAAGAAATTCAAAGAGGACAGAGAATTTGGGACAC
CAAAAAGATTTTAAAGAGATGATGTTCCTTTCGGGATTGATCGTTTGTGTTGCT
TTTTGATTTTATTTTATATTGTTATCTGTTTCTGTGTATAGACTGTTTGAGATTG
GCGCTTGGCCGACTCATTGTCTTACCATAGGGGAACGGACTTTGTTTGTGTTG
TTATTTTATTTGTATTTTATTAATAATTCTCAATGATCTGAAAAGGCCTCGAGGCT
AAGAGATTATTGGGGGGTGAGTAAGTACTTTTAAAGTGATGATGGTTACAAA
GGCAAAGGGGTAAAACCCCTCGCCTACGTAAGCGTTATTACGCC



附錄三、pTRV2 全長序列(共 9663 bp)。粗斜體底線處為引子 PYL156-F 及 PYL156-R 的位置。粗體陰影處為 multiple cloning site。

ATAAAACATTGCACCTATGGTGTGGCCCTGGCTGGGGTATGTCAGTGATCGCA
GTAGAATGTACTAATTGACAAGTTGGAGAATACGGTAGAACGTCCTTATCCAA
CACAGCCTTTATCCCTCTCCCTGACGAGGTTTTTGTTCAGTGTAATATTTCTTTT
TGA ACTATCCAGCTTAGTACCGTACGGGAAAGTGACTGGTGTGCTTATCTTTG
AAATGTTACTTTGGGTTTCGGTCTTTAGGTTAGTAAGAAAGCACTTGTCTTC
TCATACAAAGGAAAACCTGAGACGTATCGCTTACGAAAGTAGCAATGAAAGA
AAGGTGGTGGTTTTAATCGCTACCGCAAAAACGATGGGGTCGTTTTAATTAAC
TTCTCCTACGCAAGCGTCTAAACGGACGTTGGGGTTTTGCTAGTTTCTTTAGA
GAAA ACTAGCTAAGTCTTTAATGTTATCATTAGAGATGGCATAAATAATACT
TGTGTCTGCTGATAAGATCATTTAATTTGGACGATTAGACTTGTGAACTACA
GGTTACTGAATCACTTGCCTAATCAACATGGGAGATATGTACGATGAATCAT
TTGACAAGTCGGGCGGTCTGCTGACTTGATGGACGATTCTTGGGTGGAATC
AGTTTCGTGGAAAGATCTGTTGAAGAAGTTACACAGCATAAAATTTGCACTA
CAGTCTGGTAGAGATGAGATCACTGGGTTACTAGCGGCACTGAATAGACAGT
GTCCTTATTCACCATATGAGCAGTTTCCAGATAAGAAGGTGTATTTCTTTTAG
ACTCACGGGCTAACAGTGCTCTTGGTGTGATTCAGAACGCTTCAGCGTTCAA
GAGACGAGCTGATGAGAAGAATGCAGTGGCGGGTGTACAAATATTCCTGCG
AATCCAAACACAACGGTTACGACGAACCAAGGGAGTACTACTACTACCAAG
GCGAACACTGGCTCGACTTTGGAAGAAGACTTGTACACTTATTACAAATTCG
ATGATGCCTCTACAGCTTTCCACAAATCTCTAACTTCGTTAGAGAACATGGAG
TTGAAGAGTTATTACCGAAGGAACTTTGAGAAAGTATTCGGGATTAAGTTTG
GTGGAGCAGCTGCTAGTTCATCTGCACCGCCTCCAGCGAGTGGAGGTCCGAT
ACGTCCTAATCCCTAGGGATTTAAGGACGTGAACTCTGTTGAGATCTCTGTGA
AATTCAGAGGGTGGGTGATACCATATTCCTGATGCCATTAGCGACATCTAAA
TAGGGCTAATTGTGACTAATTTGAGGGAATTTCTTTACCATTGACGTCAGTG
TCGTTGGTAGCATTGAGTTTCGCAATGCACGAATTACTTAGGAAGTGGCTTG
ACGACACTAATGTGTTATTGTTAGATAATGGTTTGGT**GGTCAAGGTACGTAGTA**
GAG(PYL156F)TCCCACATATTCGCACGTATGAAGTAATTGGAAAGTTGTCAGT
TTTTGATAATTCCTGGGAGATGATACGCTGTTTGGAGGAAAAGTAGAGAAC
GTATTTGTTTTTATGTTTCAGGCGGTTCTTGTGTGTCAACAAAGATGGACATTG
TACTCAAGGAAGCACGATGAGCTTTATTATTACGGACGAGTGGACTTAGATT
CTGTGAGTAAGGTTACCGAATTCTCTAGAAGGCCTCCATGGGGATCCGGT
ACCGAGCTCACGCGTCTCGAGGCCCGGGCATGTCCCGAAGACATTAAACT
ACGGTTCTTTAAGTAGATCCGTGTCTGAAGTTTTAGGTTCAATTTAAAC**CCTAC**
GAGATTGACATTCTCG(PYL156R)ACTGATCTTGATTGATCGGTAAGTCTTTTG

TAATTTAATTTTCTTTTTGATTTTATTTTAAATTGTTATCTGTTTCTGTGTATAGA
CTGTTTGAGATCGGCGTTTGGCCGACTCATTGTCTTACCATAGGGGAACGGA
CTTTGTTTGTGTTGTTATTTTATTTGTATTTTATTAATAATTCTCAACGATCTGAA
AAAGCCTCGCGGCTAAGAGATTGTTGGGGGGTGAGTAAGTACTTTTAAAGTG
ATGATGGTTACAAAGGCAAAAGGGGTAAAACCCCTCGCCTACGTAAGCGTTA
TTACGCCCCGTCTGTACTTATATCAGTACACTGACGAGTCCCTAAAGGACGAAA
CGGGAGAACGCTAGCCACCACCACCACCACGTGTGAATTACAGGTGAC
CAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGAT
TGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACG
TTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTT
TTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATAT
AGCGCGCAAACACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT
CGGGAATTAACACTATCAGTGTTTACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGA
GAAAAGAGCGTTTATTAGAATAACGGATATTTAAAAGGGCGTGAAAAGGTTT
ATCCGTTTCGTCCATTTGTATGTGCATGCCAACACAGGGTTCCCCTCGGGATC
AAAGTACTTTGATCCAACCCCTCCGCTGCTATAGTGCAGTCGGCTTCTGACGT
TCAGTGCAGCCGTCTTCTGAAAACGACATGTCGCACAAGTCCTAAGTTACGC
GACAGGCTGCCGCCCTGCCCTTTTCTGGCGTTTTCTTGTGCGGTGTTTTAGT
CGCATAAAGTAGAATACTTGCGACTAGAACCGGAGACATTACGCCATGAACA
AGAGCGCCGCCGCTGGCCTGCTGGGCTATGCCCGCGTCAGCACCGACGACC
AGGACTTGACCAACCAACGGGCCGAACTGCACGCGGCCGGCTGCACCAAGC
TGTTTTCCGAGAAGATCACCGGCACCAGGCGCGACCGCCCGGAGCTGGCCA
GGATGCTTGACCACCTACGCCCTGGCGACGTTGTGACAGTGACCAGGCTAGA
CCGCCTGGCCCCGAGCACCCGCGACCTACTGGACATTGCCGAGCGCATCCAG
GAGGCCGGCGCGGGCCTGCGTAGCCTGGCAGAGCCGTGGGCCGACACCACC
ACGCCGGCCGGCCGCATGGTGTGACCGTGTTCGCCGGCATTGCCGAGTTTCG
AGCGTTCCCTAATCATCGACCGCACCCGGAGCGGGCGCGAGGCCGCCAAGG
CCCGAGGCGTGAAGTTTGGCCCCCGCCCTACCCTACCCCGGCACAGATCGC
GCACGCCCGCGAGCTGATCGACCAGGAAGGCCGCACCGTGAAAGAGGCGG
CTGCACTGCTTGGCGTGCATCGCTCGACCCTGTACCGCGCACTTGAGCGCAG
CGAGGAAGTGACGCCACCGAGGCCAGGCGGCGCGGTGCCTTCCGTGAGGA
CGCATTGACCGAGGCCGACGCCCTGGCGGCCGCCGAGAATGAACGCCAAGA
GGAACAAGCATGAAACCGCACCCAGGACGGCCAGGACGAACCGTTTTTCATT
ACCGAAGAGATCGAGGCGGAGATGATCGCGGCCGGGTACGTGTTTCGAGCCG
CCCGCGCACGTCTCAACCGTGCGGCTGCATGAAATCCTGGCCGGTTTTGTCTG
ATGCCAAGCTGGCGGCCTGGCCGGCCAGCTTGGCCGCTGAAGAAACCGAGC
GCCGCCGTCTAAAAGGTGATGTGTATTTGAGTAAAACAGCTTGCGTCATGC
GGTCGCTGCGTATATGATGCGATGAGTAAATAAACAATACGCAAGGGGAAC

GCATGAAGGTTATCGCTGTACTIONAACCAGAAAGGCGGGTCAGGCAAGACGA
CCATCGCAACCCATCTAGCCCGCGCCCTGCAACTCGCCGGGGCCGATGTTCT
GTTAGTCGATTCCGATCCCCAGGGCAGTGCCCGCGATTGGGCGGCCGTGCGG
GAAGATCAACCGCTAACCGTTGTCGGCATCGACCGCCCGACGATTGACCGCG
ACGTGAAGGCCATCGGCCGGCGCGACTTCGTAGTGATCGACGGAGCGCCCC
AGGCGGCGGACTTGGCTGTGTCCGCGATCAAGGCAGCCGACTTCGTGCTGAT
TCCGGTGCAGCCAAGCCCTTACGACATATGGGCCACCGCCGACCTGGTGGAG
CTGGTTAAGCAGCGCATTGAGGTCACGGATGGAAGGCTACAAGCGGCCTTTG
TCGTGTCGCGGGCGATCAAAGGCACGCGCATCGGCCGGTGAGGTTGCCGAGG
CGCTGGCCGGGTACGAGCTGCCATTCTTGAGTCCCGTATCACGCAGCGCGT
GAGCTACCCAGGCACTGCCGCCGCCGGCACAACCGTTCTTGAATCAGAACCC
GAGGGCGACGCTGCCCGCGAGGTCCAGGCGCTGGCCGCTGAAATTAATCA
AAACTCATTTGAGTTAATGAGGTAAAGAGAAAATGAGCAAAAGCACAAACA
CGCTAAGTGCCGGCCGTCCGAGCGCACGCAGCAGCAAGGCTGCAACGTTGG
CCAGCCTGGCAGACACGCCAGCCATGAAGCGGGTCAACTTTCAGTTGCCGG
CGGAGGATCACACCAAGCTGAAGATGTACGCGGTACGCCAAGGCAAGACCA
TTACCGAGCTGCTATCTGAATACATCGCGCAGCTACCAGAGTAAATGAGCAA
TGAATAAATGAGTAGATGAATTTTAGCGGCTAAAGGAGGCGGCATGGAAAAT
CAAGAACAACCAGGCACCGACGCCGTGGAATGCCCCATGTGTGGAGGAACG
GGCGGTTGGCCAGGCGTAAGCGGCTGGGTTGTCTGCCGGCCCTGCAATGGC
ACTGGAACCCCAAGCCCGAGGAATCGGCCGTGACGGTCGCAAACCATCCGG
CCCGGTACAAATCGGCGCGGGCGCTGGGTGATGACCTGGTGGAGAAGTTGAA
GGCCGCGCAGGCCGCCAGCGGCAACGCATCGAGGCAGAAGCACGCCCCG
GTGAATCGTGGAAGCGGCCGCTGATCGAATCCGCAAAGAATCCCGGCAAC
CGCCGGCAGCCGGTGCGCCGTCGATTAGGAAGCCGCCAAGGGCGACGAGC
AACCAGATTTTTTCGTTCCGATGCTCTATGACGTGGGCACCCGCGATAGTCG
AGCATCATGGACGTGGCCGTTTTCCGTCTGTGGAAGCGTGACCGACGAGCTG
GCGAGGTGATCCGCTACGAGCTTCCAGACGGGCACGTAGAGGTTTCCGCAG
GGCCGGCCGGCATGGCCAGTGTGTGGGATTACGACCTGGTACTGATGGCGGT
TTCCCATCTAACCGAATCCATGAACCGATACCGGGAAGGGAAGGGAGACAA
GCCCGGCCGCGTGTTCGTTCCACACGTTGCGGACGTACTIONAAGTTCTGCCG
CGAGCCGATGGCGGAAAGCAGAAAGACGACCTGGTAGAAACCTGCATTCCG
TTAAACACCACGCACGTTGCCATGCAGCGTACGAAGAAGGCCAAGAACGGC
CGCCTGGTGACGGTATCCGAGGGTGAAGCCTTGATTAGCCGCTACAAGATCG
TAAAGAGCGAAACCGGGCGGCCGGAGTACATCGAGATCGAGCTAGCTGATT
GGATGTACCGCGAGATCACAGAAGGCAAGAACCCGGACGTGCTGACGGTTC
ACCCCGATTACTTTTTGATCGATCCCGGCATCGGCCGTTTTCTCTACCGCCTG
GCACGCCGCGCCGACGGCAAGGCAGAAGCCAGATGGTTGTTCAAGACGATC

TACGAACGCAGTGGCAGCGCCGGAGAGTTCAAGAAGTTCTGTTTCACCGTG
CGCAAGCTGATCGGGTCAAATGACCTGCCGGAGTACGATTTGAAGGAGGAG
GCGGGGCAGGCTGGCCCGATCCTAGTCATGCGCTACCGCAACCTGATCGAGG
GCGAAGCATCCGCCGGTTCCTAATGTACGGAGCAGATGCTAGGGCAAATTGC
CCTAGCAGGGGAAAAAGGTGCGAAAAGGTCTCTTTCCTGTGGATAGCACGTAC
ATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCGGAACCCGTACATTGGGAACC
CAAAGCCGTACATTGGGAACCGGTCACACATGTAAGTGACTGATATAAAAGA
GAAAAAAGGCGATTTTTCCGCCTAAAACTCTTTAAAACTTATTAAACTCTTA
AAACCCGCCTGGCCTGTGCATAACTGTCTGGCCAGCGCACAGCCGAAGAGC
TGCAAAAAGCGCCTACCCTTCGGTTCGCTGCGCTCCCTACGCCCCGCCGCTTC
GCGTCGGCCTATCGCGGCCGCTGGCCGCTCAAAAATGGCTGGCCTACGGCCA
GGCAATCTACCAGGGCGCGGACAAGCCGCGCCGTCGCCACTCGACCGCCGG
CGCCACATCAAGGCACCCTGCCTCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAAC
CTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATG
CCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTC
GGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTT
AACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTG
AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGC
TTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTTCGGTTCGGCGAGCGGTA
TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACG
CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAA
AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
ACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
GATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTTCGCTCTCCTGTTCCGACC
CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT
TTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCA
AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATC
CGGTA ACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG
GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACTACTAGAAGGACAGTATT
TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCA
AGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTG
GTCATGCATTCTAGGTAATAAAACAATTCATCCAGTAAAATATAATTTTTATTT
TCTCCCAATCAGGCTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAATAGCTCGACATACTGT
TCTTCCCCGATATCCTCCCTGATCGACCGGACGCAGAAGGCAATGTCATACCA
CTTGTCCGCCCTGCCGCTTCTCCCAAGATCAATAAAGCCACTTACTTTGCCAT

CTTTCACAAAGATGTTGCTGTCTCCCAGGTCGCCGTGGGAAAAGACAAGTTC
CTCTTCGGGCTTTTCCGTCTTTAAAAAATCATACAGCTCGCGCGGATCTTTAA
ATGGAGTGTCTTCTTCCCAGTTTTTCGCAATCCACATCGGCCAGATCGTTATTC
AGTAAGTAATCCAATTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAGCTATTCGTATAGGGACA
ATCCGATATGTCGATGGAGTGAAAGAGCCTGATGCACTCCGCATACAGCTCGA
TAATCTTTTCAGGGCTTTGTTTCATCTTCATACTCTTCCGAGCAAAGGACGCCA
TCGGCCTCACTCATGAGCAGATTGCTCCAGCCATCATGCCGTTCAAAGTGCA
GGACCTTTGGAACAGGCAGCTTTCCTTCCAGCCATAGCATCATGTCTTTTCC
CGTTCCACATCATAGGTGGTCCCTTTATACCGGCTGTCCGTCATTTTTAAATAT
AGGTTTTTCATTTTCTCCACCAGCTTATATACCTTAGCAGGAGACATTCCTTCC
GTATCTTTTACGCAGCGGTATTTTTCGATCAGTTTTTTCAATTCCGGTGATATTC
TCATTTTAGCCATTTATTATTTCTTCTTCTTTTCTACAGTATTTAAAGATAACC
CAAGAAGCTAATTATAACAAGACGAACTCCAATTCACTGTTCCCTTGCATTCTA
AAACCTTAAATACCAGAAAACAGCTTTTTCAAAGTTGTTTTCAAAGTTGGCG
TATAACATAGTATCGACGGAGCCGATTTTGAAACCGCGGTGATCACAGGCAG
CAACGCTCTGTCATCGTTACAATCAACATGCTACCCTCCGCGAGATCATCCGT
GTTTCAAACCCGGCAGCTTAGTTGCCGTTCTTCCGAATAGCATCGGTAACATG
AGCAAAGTCTGCCGCTTACAACGGCTCTCCCCTGACGCCGTCCCGGACTG
ATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTGCCGAGCTGCCGGTCCGGGAG
CTGTTGGCTGGCTGGTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTA
GACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTAATGTACTGAATTAACGCCGAA
TTAATTCCTAGGCCACCATGTTGGGCCCGGCGCGCCAAGCTTGCATGCCTGC
AGGTCAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCAAAGA
TACAGTCTCAGAAGACCAGAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATA
TCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCGAAAG
GACAGTAGAAAAGGAAGATGGCTTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTACCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC
CACCCACGAGGAACATCGTGGA AAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAA
AGCAAGTGGATTGATGTGATGGTCAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCT
ACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAGAGGGCTATTGAGAC
TTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTA
TCTGTCACTTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGATGGCTTCTACAAATG
CCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTACCGACAGTG
GTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAACATCGTGGA AAAAGAAGACG
TTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTA
AGGGATGACGCACAATCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGG
AAGTTCATTTCAATTTGGAGAGG

附錄四、pCymMV 全長序列(共 9683 bp)。粗斜體底線處為引子 CymMVCP-F 及 CymMVCP-R 的位置。粗體陰影處為限制酶 *Sma*I 切位。

TATAGTGAGTCGTATTACAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTC
GCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGT
TGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAG
CGCCCGCTCCTTTCGCTTTCCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTC
CCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTA
CGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGC
CATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT
AATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTA
TTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA
GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAATATTAACGCTTACAA
TTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCAT
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTC
TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTT
CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCT
TATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCT
GGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC
GAACTGGATCTAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAC
GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCC
GTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAA
TGAATTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATG
ACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGG
CCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTG
AATGAAGCCATAACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGG
CAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG
GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTG
CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGA
GCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAA
ATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTCA
GACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTA
AAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAA
CGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT

CTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAA
CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTT
TTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAATACTGTTCTTCT
AGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACA
TACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC
GTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGG
TCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACC
TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTC
CCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACA
GGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTC
CTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCA
GGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTC
CTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGAT
TCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAG
CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCC
CAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGG
CACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAAT
GTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
TCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC
TATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTA
TGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGC
GAATTCCTAGTGATTGCCAATTAACCCTCACTAAAGGAAAACCAAACCTCA
CGTCTAATCCGCTATCCGAGCGAAATAGCAGCCCCAGCATAGGCAATATCGCG
CTCCATGGCCCCGAGTACGTGACACCCTTGACAGGCTCCGTGATCCGTCGGTC
CTTACCTCAATTAACGAGGAAGCCCACCGACATATCCGCCCTGTCCTTGCCCTC
GGCACTCGTAAACTGCCCTTACGCGTTGACCGAGGAAGAGGCCGACTGTCTC
GAAAATCTCGGCGTGACAGTCAATCCCTTCGCCATCCAAACGCATACACATG
CTGCAGCAAAAACCTGTTGAAAATCGCATGTTGGAAATTGTTGGCACCCACCT
TCCTAAAGAACCCTCCACCTTCATATTCCTTAAGCGGAGCAAGCTTCGCTACC
TACGACGCGCCGCCAACAACAAGACATATTTCAAACCAACACATTGAGCC
TAAAGACTTATTGCGTTACGATGACGAGTCTTGTGAAGCAATGCCAGAATGCT
CCACAAGCACAGCCTACATCAGCGATGCTCTCCATTTCTTGAGCTACGCTCAG
CTTGGGAAAATATTCCAGGATTCTCCCAAGCTAAAATTCTGCTGGCAACCCT
GGTCCTCCCCGTGGAAGCCCTCCATAGGCACCCATCTCTTTACCCTGCCATCT
ACACTTTGAACTACCATAAAGATGGCTTTGAATATATAACCGGCAATCACGCC
GGAGGTGCTTACTTCCACGAGTACTCCACTCTGCAGTGGTTGACTCTCGGAA
AACTAATTATCAACGATCCTTTGAAAGTAAAGAAACCCCTTACTCTTACTGTA
CAGCTAATAGAAAGTCTAGGGGCTAACCATCTTTTACTTATCACCCGAGGGGA

TCTTCGCACACCCAAACTGCGGACATTCGCTAAAGATAACCCATGTTCTACTAC
CACAAATATTCCATCCTAAGGGTATGAATGCGAACAAACCATTGTCCAAACGT
AGAGCTATGCAGTTGTGGCTCTACGCCAAATCTGTAAAGAGGTGAGCGAAC
GGGATCTTTATGCTAAGGTGAGGCAATTGATCCCGACTTCTGAGTTAGACCTT
TTTGACCCTGTGGAGGTGACCCATTTGGTCAATTACTTACTATTCATCAGTCA
CCTTTCCTCCGTATCTTCGTATGACGACATCTTGTCGTCTAATATCTTCCAACA
TTTCACCATTCCAATCAAGAACAAGATACGGGAATTGGTCCAGCTATTCACCG
GAGCGGACCAATTTAATCAACTGCTCAAAGCTCTCGACTGGCAAACATTTTC
GTACTCTATGCCAGTAGAGACCATCCATACACGTGCGGCCAATTATCAAGTCG
CTAAAACGCTTCGCATGTGCAGAGACCTACCATGCGATGAATATGATCGTGTA
AAGGATGTCCTCAAACAGCTCCCTGACGGAGTGACGTTGTTTGAGGAAAAC
GATAAGCAAGATCCCTCAAGCTCTGAAACCGAGGACTCTGAGGATGACACTG
ACTCCGTCGACTTCAACCTTCCCCCACTCATGACTTGCCCCAAACTTTGAT
CCTCTAGACAAGGGCAAGTCCATTATCGTTGACACCGACAACCCCTCAACTT
CCACGGCACCTGCCGTCACCTTTGCTGCCGGTATCAACTCCTCAGCCTCCAC
AAATATTTCAATTTGGAAGCTTCACACCTGAGGCTGAGGCCACCCCCCTCCTC
CCATGGAAAAGTTACCATGGGATCTTTGGATTCCCCTACTGGAACAACATGGC
TTTAAAGGAAAGAGTAAGCTGTACAAGCCCACGGGTGAACTAATCTGCCCA
TAACTGAAATCAAACAGTTCCCCACTGCCCTTTCCCGATAAAGTCCCGGA
TGGTTGTGTGCTTGCCTCAAATCTATTAAGCGTTTCGCCACAAAATGACTA
TGCTCAGTTCTCGAGCCTCCGCCTACACTTCTGACATTAAGAATAGTAGGACT
GGAAAGCTCCTACCCGCCATGAACATGCCCTGGAAAGCCTCTCTCGCCTATG
TCACTCAACATGGTGATAGAGAAATTCCTGGCGTCGTGATCCATGGCGCCGG
TGGCTGTGGCAAATCTTATGCCATCCAAAATGGTTGAGAAGCTGCTCTGATC
CTTGCGCAGCTACTGTGGTATGCCCAACTCTAGA ACTACGTAATGACTGGCTC
AATAAGATCGGAAGCTACGAACAAACGAATATCAAACCTTTCGAGAAAGCTT
TAATTCAGCCAGTCAACAACGTAGTTATCTTTGATGATTACACCAAGCTACCC
CCTGGGTACATCGAGACCATGGTGTACCATACCACAACCTCGACCTGATCAT
ATTA ACTGGGGATCCTATGCAGAGTGCCTACCATGAACTAACAGAGATGCCT
ACATCTCTTTAATACCTGATGCCTCTGCCATCTTTAGTGAGTACTGTGAGTTCA
ACATCAACGCCACCCACCGTAATGTAGCCGA ACTCGCTTGCCCTCCTCGGCGT
CTATTCTGAACGCCAAGGCAA ACTCACTGTTTCCTTCAGCGCAGCCCCACTT
TCTAAAGGTAAAGTACCCATTCTGGTACCCTCTAGAATGAAGCAAGAGGCTT
TTGCTGATGTCGGCAACCGTTGCATGACTTATGCCGGTTGCCAGGGTCTCACT
GCCCTAAAATCAAATTTTGATAGACAACCACACTACGTTCTGCTCCGAACA
AACATTATACACTTGTCTATCACGAGCTGTGGACCAAATCCACTTCATTAACA
CTGGTCCCAACTCACAGGCTTTCTGGACCAAATTAGAATCCACGCCGTACCT
AAAAGCTTTCCTCGATAATTACCGTGAGGAAACAACTGAACGGCTAACATCT

ACCGCCCCAGAGCCTGAAGTCCGTGAGCCAGCAGCCCCAAAAACGCATATC
CCTGTGCGAAAATACATCTGGCTTACGTATTTCTGCACTTGACCTGCCGAAAA
GCACTCTCGCGAGATTTTCAACAAGGCGCATGGCTTTTCCAATGCTATTCAGG
GAGATGGCGTTGCTCCCATGTTCCAGCATCAACAGGCAAAGGACGAAACCCT
TTTCAAGGCTACCATAGATGCTAGACTCTCTATAACACATCCTAATGAAAACA
AAAGAGAGTTTGCCATGAAGAAAGATACTGGGGACGTCCTTTTTTATCAATTA
CAAAGCTATAATGAATCTACCTCATGAGCCTGTTCCCTTTCGAACCTCGTCTCT
GGAACATCTGCAAAGCTGAAGTGCAGAACACATACCTAGCCAAACCCATTGC
AAATCTCATCAATGGTACCTTAAGGCAATCACCCGATTTTCCAGCCAATAAAA
TAGCCTTATTCTGAAATCGCAATGGGTAAAGAAAATTGAGAAAATTGGAGC
CATACCAGTTAAACCTGGACAGACTATTGCATCATTTATGCAAGAGACTGTTA
TGCTGTATGGCACCATGGCACGCTACCTCCGTAAGATGCGGCAAAGATTTCA
ACCCGCACATATATTTATCAATTGTGAAAAGACTCCGGAGGACTTCAACAAAT
TCGTACTTGAACACTGGTCCAACAAGCAGGTTGCCATACTAACGATTTTACT
GCTTTTGACCAGTCACAAGATGCTGCCATGCTCCAATTTGAAGTTATCAAAGC
TAGGTACTTCAATATCCCCGAGGATGTTATAGAAGGATACATCCAAATTAAGC
TCACTGCTGAAATCTTCTCGGGACACTTTCATCATGCGCCTATCTGGTGAA
GGGCCAACCTTCGACGCCAATACTGAATGCTCTATTGCCTACAACGCCACCA
GATACCATATTAATGAAGACGTCACACAAGTATACGCCGGTGACGACATGGCT
ATGGACCATGTGTGCCCTGAGAAGAAGAGCTTCAAAGCTTTGGAAAAGAAA
CTAAAATTGACCTCAAACCTCTCTATCCAAAGCAAAAACCTGGAGACTGGG
CCGATTTCTGCGGCTGGACTATAACGCCTTATGGCATCATCAAGAATCCTAAG
AAACTTGATGCATGCCTACAATTGCACACCCAACCTGGGCGATGCCGATAAAG
TCGCTAGGTCATATGCACTCGACGCCAAATATGCTTATGATCTGGGCGATCGC
ATTCATGAGGTTCTGAATGTTGATGAAATGACCAGCCACTTCAATGTTATAAG
ACAGTTGCACAACTGCATCAACAAGATGTACTGGTCCCACCTGAGACTACC
GTAGCCACAGCGGTAAAGTCTCAACCTGACGTGGAGGATCTGTGGCTCCGTG
CGCTTAGCTTCCCTGACTGGACGGACCGCGCCCAACTTTTAAAACGGGGTTA
ATTTTGATGGAGCTAGCGTACTTAGTTAGATTACTAGAGCACAATAAATTCGA
GCGCACCAATCTGCCCTTTCTCACCCCTTAGTTGTACACGGAATTGCTGGCA
GTGGAAAATCCACCATCCTCACAACCTTCTATCACCATTACCCGGCTCACCCC
ATCTTCTCACACAGTCCCACATTGCTTGACCCTAGCAACCCGCATATACCAACA
GTGCATCACTACTGATTCTGTGCCAGACGGTGCTATCGTAGACGAGTACAATT
ACAAAGCGCTCGACTACTCTCACTGTCTAGCCCTCTTCGGTGATCCACTCCA
ACTTCCACATTCACTTCAACCCCACTACTACTCTAGTCGCACCCACCGCTACG
GTCCCAAGCTCACCAGCCTACTCAACGACCTCTTCCACCTTTCTATCACTTCT
CTTGCCCCCGTTGACAGCCTTGATTACGCTGATCCTTTTGCTGTGACCCCTC
TGGATTTACCATTGCTGACGAGGAAGTGTACCACTTCGTCTCTCAGCAGGTTTC

CTGGCACTTTGTTGCCGCTCGATACTGTAGGCTTAGAATATTCTAGTGTTAGCT
TTTATTGCAGTGATCTCCGACGCTGTGTGCTACTAAGGCCACTCAGCACCTTC
ATCGCTCTCACCCGCGCCAAGGGCAACCTCATTATCTTCGATTTCAATGCCAG
GTCTAGTTCCACCACCTGACCACTCCAATCACTCTTCGTCCTTGCTATTGGT
ATAACTGTGGTCTCCGCATTATTTGTGCTAAAGTCCCACACTTTTCCGATTGCA
GGCGACAATATTCACCGCTTCCCCTCCGGCGGCCAATATAAAGACGGTACTAA
GCAGATAAACTACTGTCCGCCTACTCATGCTAGGTACCCGAAATATCCTGACT
ACAAGTGGCTTGCCGCTACCGCCGCCATCGTCATCCCTCTCTGCCTATATATTT
CCTACCATCCTGGCAATAATATTCGCCGTATTTGCCCTTGTTGCAATACATATC
ACCACCCCTGAGCCCTTCTGTACCATACACATAGACGGGGCGTCTATTACTAT
CACTAACTGCCCCGATCCTGCAGCTATATTAATAAAGTAGCCATAGGCCCT
GGCGAGGGTTAAGTTACCACAATAATTTGAAATAATCAGGGGAGAGCCCACT
CCAAC**CCCCGGG**AATAAAGTAGCCATAGGCCCTGGCGAGGGTTAAGTTAC
CACAATAATTTGAAATAATCATGGGAGAGCC(CymMVCP-F)CACTCCAACCTGG
GAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCCACTTCTGCACCCAAGTTAGCCGA
CCTGGCTGCCATTAAGTACTCACCTGTTACCTCCTCCATCGCCACACCCGAAG
AAATCAAGGCCATAACCCAATTGTGGGTAAACAACCTTGGCCTCCCCGCCGA
CACAGTAGGTACCGCGGCCATTGACCTGGCCC GCGCCTACGCTGACGTCGGG
GCGTCCAAGAGTGCTACCCTGCTCGGTTTCTGCCCTACGAAACCTGATGTCC
GTCGCGCCGCTCTTGCCGCGCAGATCTTCGTGGCCAACGTACCCCCGCCA
GTTTTGCGCTTACTACGCAAAGTGGTGTGGAATTTGATGCTGGCCACTAAC
GATCCGCCCGCCAACCTGGGCCAAGGCTGGTTTCCAGGAGGATACCCGGTTTG
CCGCCTTTGACTTTTTTCGATGCCGTCGATTCCACTGCCGCGCTGGAGCCTGCT
GAATGGCAGCGCCGCCCTACTGACCGTGAACGTGCTGCGCACTCAATCGGGA
AGTACGGCGCCCTTGCCCGTCAGCGTATCCAAAACGGCAACCTCATCACCAA
CATTGCCGAGGTCACCAAGGGCCATTTTGGCTCCACCAACACTCTTTATGCTC
TGCCTGCACCCCCTACTGAATAACGCCAAACT(CymMVCP-R)TAATAAGGCGT
GTGGTTTTTTAAAGTTTGTTCCTACTACTGGCATAATAAGTTTAGCCAGATAAA
TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTAGTGCATCGAATTCGCCGCGC
CGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGGGGCCCAATTCGCCC