

airiti
建構轉基因抗性以抗洋桔梗壞疽病毒之可能性探討

林郁璋、陳煜焜*

台中市南區 中興大學植物病理學系

* 聯絡作者, E-mail: ykchen@nchu.edu.tw

摘要

林郁璋、陳煜焜。2016。建構轉基因抗性以抗洋桔梗壞疽病毒之可能性探討。植物醫學58(3_4): 151-160。

洋桔梗 (*Eustoma russellianum* (Don.) Griseb) 為重要的切花類觀賞花卉, 在洋桔梗的栽培過程中常受到病毒病害的感染, 其中以洋桔梗壞疽病毒 (*Lisianthus necrosis virus*, LNV) 所造成的危害最具威脅性。本研究探討使用後轉錄基因靜默機制 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 誘導植物產生抗LNV之轉基因抗性之可能。針對LNV的基因體中RdRP、CP、MP等基因設計了四個目標區域, 以反向重複序列的方式構築於二元載體pBIN (pLNVRD5-IR、pLNVRD3-IR、pLNV3'CP-IR、pLNVMP-IR), 利用農桿菌轉殖法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 將其導入模式植物之圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*)。菸草 R_0 轉殖株的結果LNV RdRP基因的前半 (5'端) 所構築的反向重複序列 (pLNVRD5-IR) 所提供的轉基因抗性為最高, 可達到80.1%, 其餘三種反向重複序列構築-RdRP基因的後半 (3'端) (pLNVRD3-IR)、外鞘蛋白基因的後半 (3'端) (pLNV3'CP-IR)、與移動蛋白基因 (pLNVMP-IR) 亦可使轉殖株產生對LNV之抗性, 抗病比率依序分別為32%、41.2%與12.5%。

關鍵詞: 洋桔梗、洋桔梗壞疽病毒、反向重複序列、轉基因抗病性、圓葉菸草。

前言

洋桔梗 [*Lisianthus*, *Eustoma russellianum* (Don.) Griseb] 為我國三大重要外銷切花商品之一。在洋桔梗的栽培過程中常受到各類病原之為感染, 尤其是病毒病害的危害, 其中以洋桔梗壞疽病毒 (*Lisianthus necrosis virus*, LNV)⁽⁸⁾ 與木瓜捲葉廣東病毒 (*Papaya leaf curl Guangdong virus*, PaLCuGdV)⁽⁹⁾ 分別在洋桔梗花瓣引起褪色條斑 (color breaking) 和形成條狀贅生組織 (enation)

直接危害切花品質, 對產業較具威脅性。為了使植物具備病毒抗性, 建構轉基因抗性是傳統的抗病育種之外的另一選項。

建構植物轉基因抗性的研究始於表現病毒蛋白或部分核酸序列以引發專一性的抗病反應^(1, 20, 21, 24), 漸次發展成以誘發植物體內之後轉錄基因靜默 (Post-transcriptional gene silencing, PTGS) 為主要的機制^(3, 35)。為了有效提升病毒病害的防治效率, 將病毒基因體中特定序列片段經過適當構築後導入寄主植物中, 進而強化PTGS反應, 轉基因植株的育成為目前之防治趨勢。其中, 以反向重複序列 (inverted-repeat, IR) 的構築方式所形成的dsRNA或hairpin RNA (hpRNA) 與病毒複製時形成的中間產物 (複製型, replication form) 相似, 可提高基因靜默的效率, 促進病毒RNA分解^(31, 36, 38)。眾多例證顯示, 利用反向重複序列的構築可有效應用於轉基因植物以抗RNA和DNA病毒^(11, 33, 36, 39, 41)。

洋桔梗壞疽病毒 (LNV) 最初發現於日本^(15, 16), 繼而於台灣⁽⁸⁾, 感染洋桔梗引起全株系統性壞疽及花瓣條斑等病徵 (圖一)。LNV依ICTV之分類⁽¹⁷⁾, 為長茄斑駁皺葉病毒 (*Eggplant mottled crinkle virus*, EMCV) 的同種異名, 屬Tombusviridae科 *Tombusvirus* 屬之成員, 亦可危害於彩色海芋^(6, 10)。LNV病毒顆粒形態為球形正二十面體, 直徑約32-33 nm。基因體由一條正極單股RNA構成, 核酸全長為4764個核苷酸 (DQ011234), 具四個轉譯架構 (open reading frames, ORFs), 由5'端至3'端依序是RNA複製酶 (RdRp)、外鞘蛋白 (CP)、移動蛋白 (MP)、和靜默抑制子 (silencing suppressor, p19) 等基因⁽⁵⁾。LNV為土壤傳播的病毒 (soil-borne virus)^(8, 17), 或謂可經由 *Olipidium* sp. 傳播⁽¹⁵⁾, 不過確實的生物媒介與傳播機制仍有待釐清⁽¹⁷⁾。

本研究以LNV之基因體為藍本, 分段取四個區域, 以反向重複序列 (IR) 的方式構築於二元載體 (binary vector) 中, 利用農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404) 轉殖於圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*), 探討以PTGS的機制誘導抗病之效果, 比較並評估不同的構築能提供對抗LNV之抗性程度, 以建構抗病毒之轉基因洋桔梗之參考。



圖一、洋桔梗壞疽病毒 (LNV) 感染洋桔梗造成的病徵。A、洋桔梗病株呈現系統性壞疽，包括葉片的黃化壞疽斑與花瓣的變色條斑；B、葉片的黃化壞疽斑近照。

Fig. 1. Symptoms of lisianthus plants (*Eustoma rusellianum*) infected by Lisianthus necrosis virus (LNV) in the field. A, Diseased lisiathus plant showing systemic chlorotic necrosis on leaves and breakings on flower petals. B, A close-up of chlorotic necrosis on leaves.

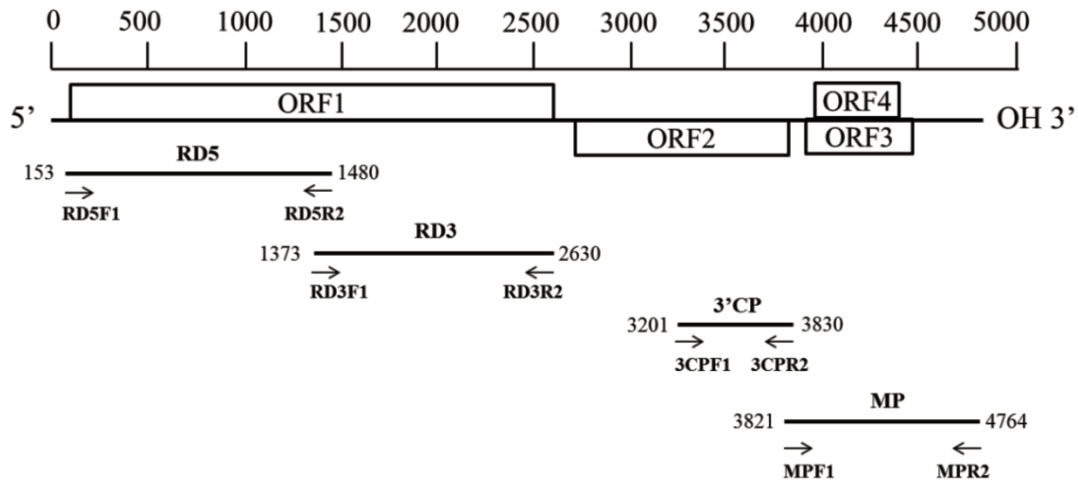
材料與方法

病毒來源與接種

洋桔梗壞疽病毒分離自彩色海芋 (LNV Zantedeschia isolate, LNV-Z)^(6, 10)。以 0.01 M 磷酸緩衝液 (potassium phosphate buffer, pH 7.0) 研磨罹病組織之粗汁液 (w/v = 1:10)，依常規之機械接種方式接種於圓葉菸草 (*N. benthamiana*) 以保存接種源，並用為抗病篩選時挑戰接種之用。

目標基因之選殖與轉殖載體之構築

自 LNV 基因體核酸選定 4 個片段，分別包括 RdRp 的 5' 端半部 (RD5)、RdRp 的 3' 端半部 (RD3)、CP 的 3' 端半部 (3'CP) 和移動蛋白基因 (MP) 以及其下游之 3' 端未轉譯區 (圖二)。自 LNV 感染之病組織萃取總量 RNA，以掛有 *NotI* 和 *BamHI* 限制酶切位的專一性引子對 (表一) 用 RT-PCR 增幅出目標片段 (RD5、RD3、3'CP、MP)。將目標片段選殖於 TOPO II TA 選殖套組 (TOPO II TA cloning kit, Invitrogen, USA) 進行基因選殖。選取殖入目標片段之選殖株質體 DNA 送交至國立中興大學生物科技發展中心定序。確認序列之目標片段分別利用 *NotI* 及 *BamHI* (New England Biolabs, USA) 限制酵素將 cDNA 片段從選殖載體 TOPO II 切下，並與兩端皆具有 *BamHI* 切位的 intron 片段 (*Arabidopsis thaliana actin 2* intron, 449 nt)⁽²⁾ 以 T4 DNA ligase (Promega, USA) 同時黏合於事先利用 *NotI* 處理過 pRAP 載體⁽²⁷⁾ 上，完成反向重複序列構築 (IR)。目標 cDNA 片段以 IR 的方式黏合在 pRAP



圖二、洋桔梗壞疽病毒 (LNV) 基因體簡圖與選殖策略。LNV 基因體含四個轉譯架構 (ORF)，ORF1 轉譯出 RNA 複製酶 (RdRp)，ORF2 轉譯出外鞘蛋白 (CP)，ORF3 為移動蛋白 (MP)，ORF4 則為 p19 靜默抑制子。黑線表示該反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 增幅之 cDNA 片段所涵蓋之基因長度範圍，黑線之上、右數字表示與該 cDNA 片段相對應之核苷酸起始/終止位置，黑線下之箭頭表示該引子之方向性。分別選殖四個 cDNA 片段，包括 RdRp 的 5' 端半部 (RD5)、RdRp 的 3' 端半部 (RD3)、CP 的 3' 端半部 (3'CP)、和含 3' 端未轉譯區 (3' UTR) 和移動蛋白基因 (MP)。

Fig. 2. Schematic genome organization of Lisianthus necrosis virus (LNV) and cloning strategy. The genome of LNV contains 4 open reading frames, ORFs 1 - 4, and encodes RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), coat protein (CP), movement protein (MP), and silencing suppressor (p19), respectively. The corresponding positions of individual functional protein genes. Black lines indicate the length and coverage area of cDNA fragment amplified by RT-PCR. The left and right numeric digits above the black lines indicated the corresponding nucleotide start / end positions of cDNA fragments. The arrows below the black lines indicated the direction of the primers. Four cDNA fragments, including 5'-half of RdRp (RD5), 3'-half of RdRp (RD3), 3'-half of CP (3'CP) and MP which includes movement protein gene and 3' non-translating region (3'-UTR).

表一、本研究中所使用的引子對序列

TABLE 1. List of primer sequences used in this study.

Primers	Sense/ antisense (+/-)	Sequence (5' to 3')	Expect product size (bp)	Target
RD5-F1	+	CCC CGCGCCGCCCAATAAGCATGG	1328	RdRp gene 5'-half
RD5-R2	-	CCCCGGATCCCAGACGGGGGAGATATGCA		
RD3-F1	+	CCC CGCGCCGCCGAGTTGCCACCG	1258	RdRp gene 3'-half
RD3-R2	-	CCCCGGATCCTTCACTTGGTCAAGCTACG		
3'CP-F1	+	CCC CGCGCCGCTGAGCTGTGG	630	coat protein gene
3'CP-R2	-	CCCCGGATCCAAGAGGCCCGAGGCGACT		3'-half
MP-F1	+	CCC CGCGCCGCGGGCCTCTTGAAC	944	movement protein
MP-R2	-	CCCCGGATCCGGGCTGCATTTCTGCAATG		to 3'-UTR
NPTII-F	+	CCCTCGGTATCCAATTAGAG	0.9k	<i>nptII</i>
NPTII-R	-	CGGGGGTGGGCGAAGAACTCCAG		
18S-F	+	CGCATCATCAAAATTTCTGC	0.85k	18S rRNA
18S-R	-	TTCAGCCTTGCACCATACT		

載體上35S promoter及NOS terminator之間，再將整個cassette以限制酵素AscI及PacI (New England Biolabs, USA)進行酶切，黏合於同樣以AscI及PacI處理的二元載體pBIN (binary vector)⁽³⁴⁾上(圖三)。完成之IR載體選殖於*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404，供後續植物轉殖之用。

轉基因菸草

圓葉菸草(*N. benthamiana*)經表面消毒後，將葉肉切割成約1 cm²大小的組織塊，作為農桿菌感染的培植體。以轉殖IR載體的農桿菌液進行接種。接種完成的培植體放置於培養基(每公升含4.4 g MS salts、30 g sucrose、1 mg BA)進行共培養(25°C、3天)。再將培植體移至選擇性培養基(含kanamycin 300 ppm及carbenicillin 500 ppm)進行篩選。以抗生素篩選約3週後可獲得芽體，將芽體切下移至發根培養基(Rooting medium，不含BA)進行發根。待根系發展健全，即可將根系周圍的培養基清洗乾淨，以1000倍稀釋的免賴得浸泡後，種植在裝有濕潤栽培介質的三吋盆內，並套袋保濕，3天後剪去套袋兩角，再2天即可拆袋完成馴化⁽¹⁴⁾。

菸草轉植株及F₁子代篩選與挑戰接種

利用常規之機械接種方式將稀釋100倍的洋桔梗壞疽病毒(LNV)病葉粗汁液接種於菸草轉植株之葉片上，同時接種未轉殖之圓葉菸草作為對照組。持續觀察病徵之發展，並應用LNV專一性抗血清⁽⁶⁾於間接式ELISA(indirect ELISA)⁽¹⁸⁾以檢測供試轉基因菸草之感染與否。將抗病等級定義為如下：接種後與對照組同時發病者定義為感病(susceptible, S)，可延遲發病1-10天者為低度抗病(low-resistance, LR)，可延遲發病11-20天者為中度抗病(moderate-resistance, MR)，接種後經過26天至一個月仍未發病者為高度抗病(high-resistance, HR)。

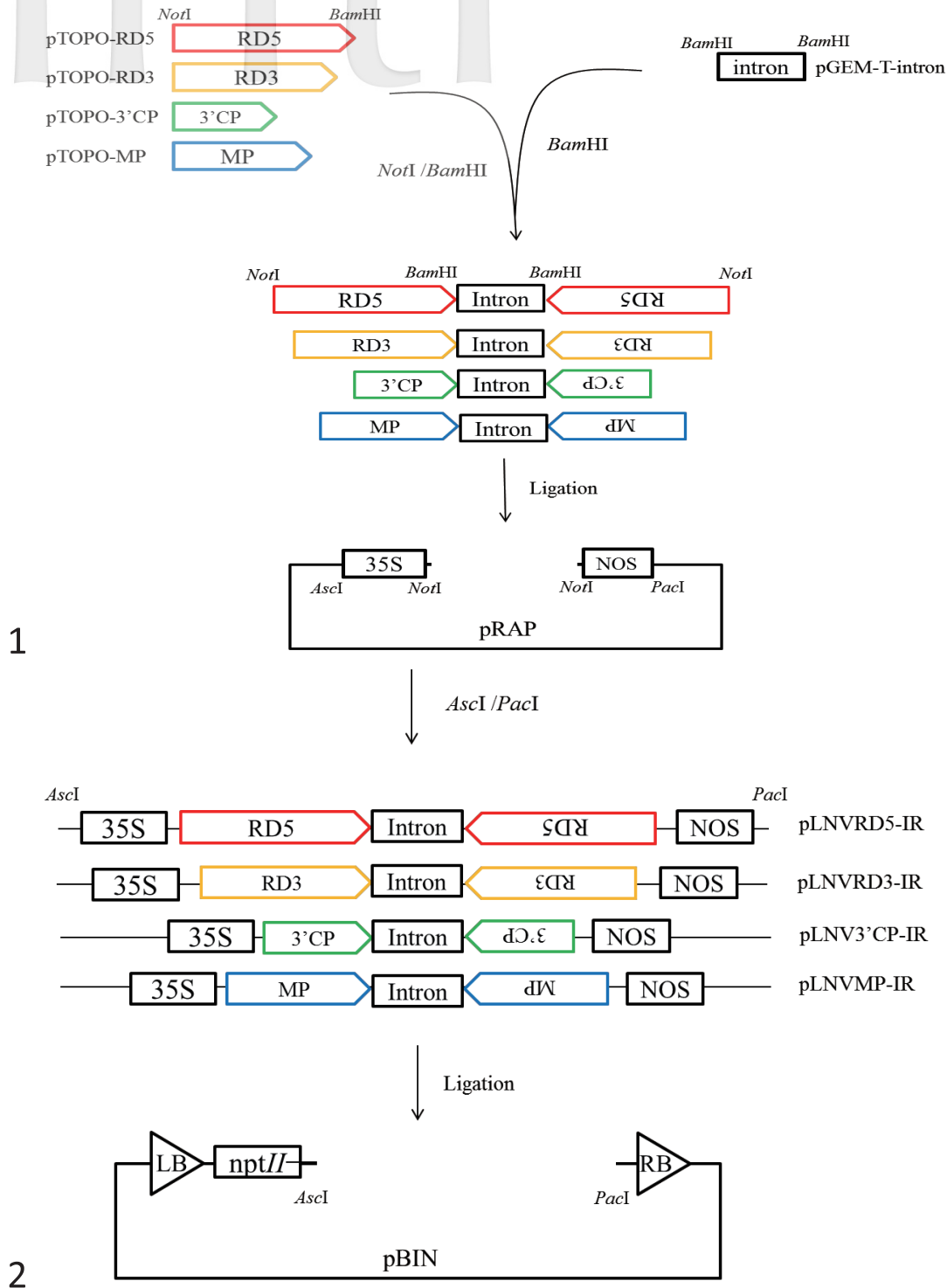
收集各抗病轉植株系的F₁種子，經過表面消毒後播種於含有300 ppm kanamycin的選擇性培養基(每公升含4.4 g MS salts、30 g sucrose、1 mg BA)中，置於25°C植物生長箱中培養。篩選後選取綠色的幼苗，播植於栽培介質上。利用機械接種的方式將稀釋100倍的LNV病葉粗汁液接種於F₁子代之葉片上，同時接種未轉殖之圓葉菸草做為對照組，記錄各株系F₁子代發病情形，並以ELISA檢測LNV之感染。

間接酵素連結免疫吸附反應

將挑戰接種一個月的轉植株葉片樣本以PBS緩衝液(8 g NaCl、0.2 g KH₂PO₄、2.9 g Na₂HPO₄·12H₂O、0.2 g KCl、0.2 g NaN₃，加水至1 L，pH7.4)進行50倍稀釋後，取100 µl粗汁液加入96孔微量盤之孔穴中，置於37°C培養箱培養1小時，接著以PBST(每公升PBS加入0.5 ml Tween-20)清洗三次，每次3分鐘後甩棄PBST。取100 µl稀釋2000倍的LNV兔子抗血清⁽⁶⁾加入盤穴中，於37°C靜置1小時後，同前法以PBST清洗三次。取100 µl稀釋5000倍的二次抗體(Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Alkaline Phosphatase (AP) Conjugate, novex, Life technology, USA)加入盤穴，於37°C靜置1小時，並以PBST清洗三次後，在每個盤穴分別加入100 µl以受質緩衝液(substrate buffer, 97 ml Diethanolamine、0.2 g NaN₃、800 ml ddH₂O, pH 9.8)配製的酵素基質(nitrophenyl phosphate, 1 mg/ml)溶液進行呈色。每隔5分鐘以ELISA測讀機(Bio-Tek Instruments, Burlington, VT, USA)讀取波長405 nm (OD₄₀₅)之吸收值，相對健康對照組之讀值的3倍作為正反應之判定依據⁽¹⁸⁾。

北方轉漬法(Northern blotting)

首先準備待測樣本之total RNA，於烘箱乾燥後以30 µl DEPC-H₂O回溶產物。取20-25 µg的RNA與3X loading dye混



圖三、以洋桔梗壞疽病毒 (LNV) 基因序列構築反向重複序列 (inverted-repeat, IR) 轉基因載體之示意圖。將選殖的 RdRp 基因的 5' 端半部 (RD5)、RdRp 基因的 3' 端半部 (RD3)、外鞘蛋白基因的 3' 端半部 (3'-CP)、移動蛋白基因至 3' 端非轉譯區 (MP) 片段分別與 intron 片段 (*Arabidopsis thaliana actin2*) 黏合，以反向重複序列 (inverted-repeat, IR) 的形式構築於 pRAP 載體上，獲取 35S-NOS cassette 後再轉入二元轉殖載體 pBIN 上。

Fig. 3. Schematic diagram of constructing inverted-repeat (IR) constructs with cDNA fragments derived from *Lisianthus necrosis virus* genome. Fragments of 5'-half of RdRp (RD5), 3'-half of RdRp (RD3), 3'-half CP gene (3'CP) and movement protein gene as well as 3'-nontranslating region (MP) were individually cloned into pRAP vector together with intron (*Arabidopsis thaliana actin2*) in the form of IR. The 35S-NOS cassettes were obtained and cloned these constructs into binary vector pBIN.

合，加入15%聚丙烯醯胺 (polyacrylamide, 每100 ml中含有50 ml 30% 19:1 acrylamide、1.08 g Tris、0.55 g Boric acid、0.074 g EDTA、42 g Urea、DEPC-H₂O補至100 ml)膠體中，以150伏特進行電泳2小時。將濾紙浸溼置於轉印器上，接著疊上Hybond-N+membrane及膠片，再放上一張濕潤濾紙，以5伏特轉印50分鐘。轉印完成後取出轉印膜，使用UV-stratalinker將RNA固定在膜上，按照標準設定進行兩次固定 (fixation)。膜以正面朝上的方式放入盒中，加入雜合緩衝液 (ULTRAhyb[®]-Oligo Hybridization buffer, Ambion, USA)，在42°C雜合烘箱 (Thermo, USA)中搖震進行前雜合 (prehybridization) 1小時；同時做探針 (probe)的製備，以Primer-It II random primer labeling kit (Stratagene, LaJolla, CA)配合事先合成好的目標片段DNA模板，加入³²P-ATP，於37°C作用1小時。復以100°C加熱5分鐘後，立刻置於冰上冷卻。前雜合完成之後，將放射性標定探針加入緩衝液中，於42°C雜合烘箱 (Thermo, USA)中搖震10小時以上進行雜合反應 (hybridization)。以2X SSC buffer (0.3M NaCl、0.03M Na₃ citrate · 2H₂O、0.1% SDS)清洗膜2-3次，洗去多餘放射線，並在暗房中壓片 (Hyperfilm Mp, Amersham Pharmacia Biotech, UK)，將片夾 (cassette)靜置於-80°C，待曝光至適當程度後回溫片夾，於暗房中進行底片顯影及固定。

結果

LNV目標基因之選殖及反向重複序列 (IR) 轉基因載體之構築

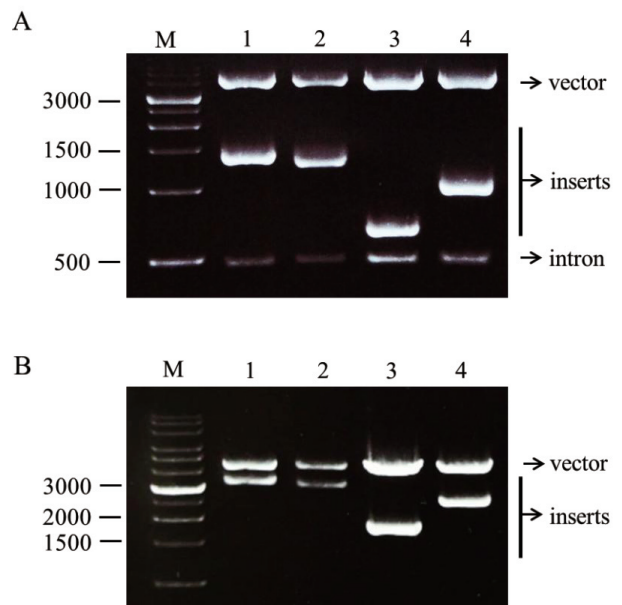
於LNV基因體全長選取五個區域，包括RdRP基因的5'端半部 (RD5)、RdRP基因的3'端半部 (RD3)、外鞘蛋白基因的3'端半部 (3'-CP)、以及移動蛋白基因 (MP)及其下游之未轉譯區 (3'-UTR)作為本次實驗進行轉殖的目標基因 (圖二)，並據以設計專一性引子對 (表一)。以RNA複製酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)做為目標選殖RD5及RD3這兩個片段，分別位於基因體中第153個至1480個核苷酸與第1373個至2630個核苷酸，長度各為1328 bp及1258 bp。選取對應外鞘蛋白 (coat protein)基因的後半段序列第3201個至3830個核苷酸作為3'CP的模板，長度為630 bp。MP與下游之3'-UTR片段則涵括第3821個至4764個核苷酸，長度為944 bp。MP片段除了移動蛋白 (movement protein)的基因序列之外，也包含了3'端非轉譯區 (3'-UTR)序列。所設計之四組專一性引子對 (RD5F1 /RD5R2、RD3F1 /RD3R2、3'CPF1 /3'CPR2、MPF1/MPR2) (表一)，均可增幅出預期之目標基因cDNA片段，其大小依序為1.3 kb、1.2 kb、0.63 kb及0.95 kb。

將選殖於TOPO II之目標基因片段 RD5、RD3、3'-CP、以及MP，以限制酵素NotI及BamHI進行酶切，並將產物與0.5 kb的intron (*Arabidopsis thaliana actin2* intron, 449 nt)黏合於pRAP載體上，完成IR構築 (圖三)。同時使用NotI/BamHI確認插入之各個片段大小 (圖四、A)，以及單獨使用NotI確認IR構築

的正確性 (圖四、B)。確認無誤後以AscI/ PacI裁切下包含35S promoter與NOS terminator的表現基因片匣 (gene cassette)，轉到pBIN載體上 (圖三)，分別獲得pLNVRD5-IR、pLNVRD3-IR、pLNV3'CP-IR及pLNVMP-IR等四個反向重複序列轉基因載體。上述之四個反向重複序列轉基因載體，再分別選殖入農桿菌。

菸草轉殖

載有pLNVRD5-IR、pLNVRD3-IR、pLNV3' CP-IR及pLNVMP-IR等反向重複序列轉基因載體之農桿菌分別對圓葉菸草葉片培植體進行感染。培植體於接種3-4週後會長出癒傷



圖四、以限制酵素酶切確認於pRAP載體上四個洋桔梗壞疽病毒(LNV)之轉基因構築。A、同時以NotI/BamHI進行酶切，可切下載體 (vector, pRAP, 4 kb)、各插入片段、以及intron (*Arabidopsis thaliana actin 2*) (449 bp)。行1-4中 所切出的插入片段 (insert)分別為RdRP基因的5'-端半部 (RD5, 1328 bp)、RdRP基因的3'-端半部 (RD3, 1258 bp)、外鞘蛋白基因的3'-端半部 (3'CP, 630 bp)、與移動蛋白基因至3'端非轉譯區 (MP, 944 bp)。M為DNA marker (base pair, bp)。B、單獨以NotI進行酶切，可切下載體中完整的反向重複序列 (IR)構築。行1-4分別為RD5-IR (3.1 kb)、RD3-IR (2.9 kb)、3'CP-IR (1.7 kb)、MP-IR (2.3 kb)。M為DNA marker (base pair, bp)，載體為pRAP。

Fig. 4. Patterns of *Lisianthus necrosis virus* (LNV)-based inverted-repeat (IR) constructs after restriction enzyme digestion. A. IR constructs digested with restriction enzymes *NotI* and *BamHI* simultaneously to separate vector (pRAP, 4 kb), inserts, and intron (*Arabidopsis thaliana actin 2*) (449 bp). Inserts in lanes 1-4 are 5'-half of RdRP gene (RD5) (1328 bp), 3'-half of RdRP gene (RD3) (1258 bp), 3'-half of coat protein gene 3'-half (3'-CP) (630 bp), and movement protein gene to 3'-UTR (MP) (944 bp), respectively. M is DNA marker (base pair, bp). B. IR constructs digested with restriction enzyme *NotI* to separate IR cassettes from vector (pRAP, 4 kb). Inserts in lanes 1-4 are RD5-IR (3.1 kb)、RD3-IR (2.9 kb)、3'CP-IR (1.7 kb)、MP-IR (2.3 kb). M is DNA marker (base pair, bp).

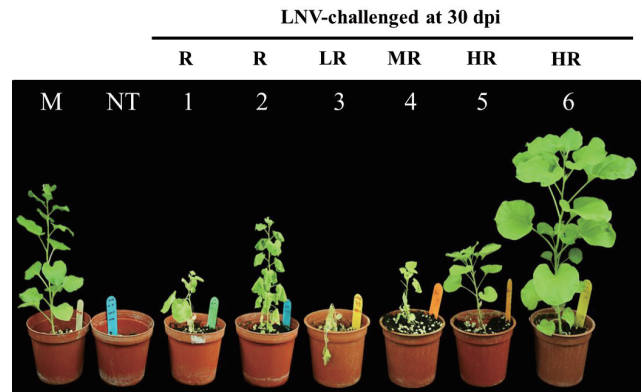
組織，再經2-3週後各培植體上即可觀察到大小不等的芽體。將芽體切下移至選擇性培養基中篩選，接著以發根培養基進行發根約2週，最後移土馴化1週。轉殖率及馴化成功率最高的構築是pLNVRD5-IR，其次為pLNVRD3-IR。pLNV3'CP-IR的轉殖株較不易馴化，部分植株在拆袋後即萎凋。由於pLNVMP-IR完成構築的時間較晚，因此進行菸草轉型的次數不及其餘三個構築，所獲得的轉殖株數量相對較少。馴化成功的轉殖株數量分別為：pLNVRD5-IR有42個株系、pLNVRD3-IR有25個株系、pLNV3'CP-IR有17個株系及pLNVMP-IR有16個株系。所獲得的轉殖株全數接受LNV挑戰接種，以進行抗病篩選試驗。

轉基因菸草(T_0)之病徵觀察

挑戰接種試驗的LNV接種源為稀釋100倍 (w/v)的病葉粗汁液，非轉殖的對照植株發病時間較以稀釋10倍 (w/v)的病葉粗汁液接種者晚2天，於接種後第5天發病。非轉殖植株在接種葉上出現透化壞疽斑，並於第7天全株萎凋死亡。因此將接種後第5天的發病情形做為區分抗感病之依據。在四種轉基因構築 (pLNVRD5-IR、pLNVRD3-IR、pLNV3'CP-IR、pLNVMP-IR)的轉殖株中，全數為抗病的表現型。但抗病的程度有差別，分為低度抗病(low resistance, LR)、中度抗病(moderate resistance, MR)、與高度抗病(high resistance, HR)，以及恢復 (recovery) 等。可延遲發病1-10天者為低度抗病(LR)、可延遲發病11-20天者為中度抗病(MR)、接種後經過26天至一個月仍未發病者為高度抗病(HR)。恢復 (recovery)則是在接種後出現病徵，但植株並不會死亡，新生葉片外觀如同健康植株者。在延遲發病的植株發病後，其病徵與非轉殖株的病徵相同。其中pLNVRD5-IR的轉殖株有兩個株系 (pLNVRD5-IR-8、pLNVRD5-IR-10)在接種後產生典型的接種葉壞疽、以及萎凋病徵。pLNVRD5-IR-8所提供的抗性可延遲發病4天，屬於低度抗病；pLNVRD5-IR-10則可延遲發病至19天，屬於中度抗病。持續觀察後發現植株並沒有死亡且新葉健全，發生病徵恢復 (recovery)的現象，pLNVRD5-IR-8與pLNVRD5-IR-10在接種後一個月仍然存活，視為具有抗性之植株 (圖五)。

轉基因菸草之抗病分析

選取接種一個月後未產生病徵的高度抗病植株進行篩選標記(*nptII*基因)與病毒感染之檢測。結果顯示均可自受測的轉基因植株之DNA中以PCR增幅出*nptII*基因之相關片段；indirect ELISA亦未自表現抗性的轉基因植株中測得LNV病毒感染(未出示結果)。菸草轉殖株抗病的表現型，有程度上的差異：42個pLNVRD5-IR轉殖株系中有14.3%屬於低度抗病、9.5%屬於中度抗病，高度抗病的比例則高達76.2%，其中在低度抗病及中度抗病的類別中各有一個株系 (pLNVRD5-IR-8與pLNVRD5-IR-10)產生病徵恢復的性狀，並且在新生的葉片組織中無法測到LNV感染，視為抗病植株，因此pLNVRD5-IR轉殖株的抗病效率為80.1%。pLNVRD3-IR共有25個轉殖株系，其中低度抗病



圖五、菸草轉殖株挑戰接種洋桔梗壞疽病毒(LNV)30天後之發病情形。1和2分別為轉基因株系pLNVRD5-IR-8和pLNVRD5-IR-10，發病後恢復(recovery, R)；3和4分別為轉基因株系pLNVMP-IR-2和轉基因株系pLNV3'CP-IR-10，表現低度抗病(low resistance, LR)與中度抗病 (moderate resistance, MR)；5和6分別為轉基因株系pLNVRD3-IR-16和pLNVRD5-IR-18，表現高度抗病(high resistance, HR)。NT為非轉殖圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*)接種LNV，M為未接種LNV的非轉殖菸草。

Fig. 5. Development of symptom on transgenic tobacco lines 30 days after challenge inoculation with *Lisianthus necrosis virus* (LNV). Plants 1 and 2 are transgenic lines pLNVRD5-IR-8 and pLNVRD5-IR-10, respectively, showing recovery (R) from infection; plants 3 and 4 are transgenic lines pLNVMP-IR-2 and pLNV3'CP-IR-10, showing low and moderate resistance (LR and MR), respectively; plants 5 and 6 are transgenic lines pLNVRD3-IR-16 and pLNVRD5-IR-18, showing high resistance (HR). NT is a non-transgenic tobacco plant (*Nicotiana benthamiana*) inoculated with LNV while M indicates mock tobacco plant.

佔44%，中度抗病佔24%，高度抗性為32%。pLNV3'CP-IR有17個轉殖株系，低度抗病為11.8%，中度抗病則有47.1%，高度抗性為41.2%。pLNVMP-IR有16個轉殖株系，其中低度抗病者佔37.5%，中度抗病佔50%，而高度抗病僅有12.5% (表二)。綜上所述，各轉基因載體轉殖植物後的抗病表現，以pLNVRD5-IR能提供圓葉菸草最佳的抗性，在未來洋桔梗抗性構築上具有相對較高的潛力。

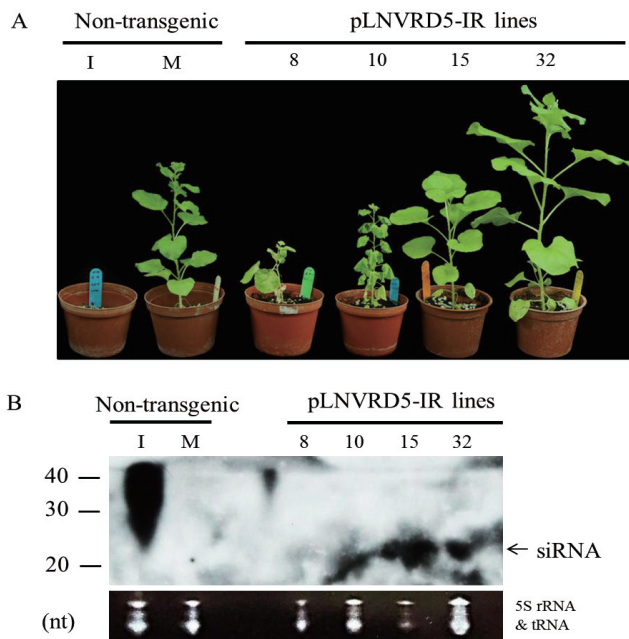
將LNVRD5-IR轉基因菸草 F_1 種子播於kanamycin選擇性培養基進行篩選，發芽後挑選綠色芽體播種在栽培介質上。以機械接種的方式將稀釋100倍的洋桔梗壞疽病毒(LNV)病葉粗汁液接種於pLNVRD5-IR轉基因構築株系之 F_1 子代上，其中包含LNVRD5-IR-12、LNVRD5-IR-14、LNVRD5-IR-17、LNVRD5-IR-21、LNVRD5-IR-22 及LNVRD5-IR-23。所接種的各株系 F_1 植株於接種10天後均未出現病徵，非轉基因圓葉菸草之對照組則於接種後第5天發病。

轉基因 R_0 菸草siRNA偵測

於挑戰接種30天後選取pLNVRD5-IR其中4個株系，低度抗病之pLNVRD5-IR-8與中度抗病之pLNVRD5-IR-10為挑戰接種試驗中發生病徵恢復之株系，而pLNVRD5-IR-15與pLNVRD5-

表二、轉基因Ro圓葉菸草 (*N. benthamiana*) 接種洋桔梗壞疽病毒 (LNV) 之抗病表現TABLE 2. Resistance levels of transgenic *Nicotiana benthamiana* after challenge inoculation by *Lisianthus necrosis virus* (LNV)

Transgenic constructs	Total line no.	Susceptible	Low- resistant	Moderate- resistant	Recovery	High- resistant
pLNVRD5-IR	42	0%	6/42 (14.3%)	4/42 (9.5%)	2/42 (4.8%)	32/42 (76.2%)
pLNVRD3-IR	25	0%	11/25 (44%)	6/25 (24%)	0%	8/25 (32%)
pLNV3'CP-IR	17	0%	2/17 (11.8%)	8/17 (47.1%)	0%	7/17 (41.2%)
pLNVMP-IR	16	0%	6/16 (37.5%)	8/16 (50%)	0%	2/16 (12.5%)
Non-transgenic <i>N. benthamiana</i>	50	50/50 (100%)	0%	0%	0%	0%



圖六、抗病的轉基因株系 (pLNVRD5-IR) 之抗病反應與小片段干擾RNA (siRNA) 之檢測。A、轉基因株系 (pLNVRD5-IR) 接種洋桔梗壞疽病毒 (LNV) 30 天後之抗病表現。B、以北方轉漬法 (Northern blotting) 偵測抗病之菸草轉殖株系 (pLNVRD5-IR) 之 siRNA 的表現。高度抗病的轉殖株系 pLNVRD5-IR-15 及 pLNVRD5-IR-32 在 21-22 nt 的位置上可觀察到 siRNA 訊號。I: 非轉殖圓葉菸草接種 LNV, M: 非轉殖圓葉菸草未接種 LNV 之負對照組 (M, mock)。

Fig. 6. Resistance performance and detection of small interfering RNA (siRNA) on resistant transgenic lines harbored inverted repeat construct (pLNVRD5-IR) derived from *Lisianthus necrosis virus* (LNV). A, Highly resistant transgenic lines of pLNVRD5-IR show no symptoms 30 days after challenge inoculation by LNV. B, Small interfering RNAs with size of 21-22 nt could be detected on transgenic pLNVRD5-IR lines 15 and 32. The letter I indicates plants inoculated non-transgenic tobacco by LNV. And M indicates mock.

IR-32 為高度抗病的轉殖株中生長情形較佳的株系 (圖六、A)。抽取上述 4 個轉殖株系之 total RNA 後經過北方轉漬法 (Northern blotting) 分析。其中 pLNVRD5-IR-15 及 pLNVRD5-IR-32 這兩個轉殖株系在大小約 21-22 nt 的位置觀察到訊號產生 (圖六、B)。使用感染 LNV 的非轉殖圓葉菸草做為正對照組, 在 20-

40 nt 的位置偵測到大量訊號, 此為病毒誘導的基因靜默 (virus induced gene silencing, VIGS) 所產生之未降解完全的病毒 RNA 及 siRNA。以未轉殖之圓葉菸草為負對照組 (mock), 則沒有 siRNA 的訊號。

討論

洋桔梗壞疽病毒 (LNV) 在台灣的感染紀錄主要分布在中南部一帶, 推測在栽培田區的土壤中可能存在其傳播媒介, 雖已證實 LNV 可藉由土壤傳播, 但是目前尚未分離出媒介及釐清傳播機制⁽¹⁷⁾。由於 LNV 感染植株後並不會侷限於根部, 而是在侵入之後迅速轉移至地上部引發立即且顯著的危害, 再加上病毒顆粒在生體外也相當穩定, 可於粗汁液中存活九週以上^(8, 15)。此病毒通常引起壞疽的病徵, 在田間容易被誤判為真菌或細菌性病害, 導致延誤了防治時機, 其危害之潛力不容忽視。LNV 對洋桔梗植株造成的破壞性危害, 對臺灣的切花外銷市場來說是相當嚴重的問題, 期望能找出有效的防治策略, 改善 LNV 及其他病毒病害對花卉產業的影響。

在植物病害防治方面, 尚未發展出適當的化學藥劑能預防及治療病毒病害。除了選用健康種苗之外, 還需要搭配媒介昆蟲的防除以及田間衛生管理等, 然而這些預防措施所能發揮的效果有限, 因此提高作物本身對抗病毒的能力成為解決病毒病害問題的方法。抗病育種需要投入長期的研究工作, 面對病毒的高變異性, 其抗性有被攻破的風險, 交互保護的施行則需要一一接種每棵苗木, 再加上弱系病毒可能經由突變或複合感染成為強系病毒等虞慮, 並不符合現今的栽培體系。當 Sanford 與 Johnston⁽²⁵⁾ 提出病原衍生抗性 (pathogen-derived resistance, PDR) 的概念後, 各種轉基因建構抗性的相關報告不斷產出, 各方學者對於抗病機制的研究不遺餘力, 於是以基因工程建構轉基因抗性成為當前植物病毒防治策略的主流。根據研究報告指出, 在植物體內同時表現正向及反向的病毒 RNA 序列, 可以有效引發後轉錄基因靜默 (post-transcription gene silencing, PTGS) 並誘導病毒抗性產生, 其中以反向重複序列 (inverted-repeat) 的構築方式所形成的 dsRNA 或 hairpin RNA (hpRNA) 結構可提高基因靜默的效率, 促進病毒 RNA 分解^(31, 38)。陸續有研究團隊將上述的原理應用在不同病毒的防治策略上。其中, 在圓葉菸草上

構築對胡瓜嵌紋病毒 (CMV)⁽¹¹⁾抗性的報告是選取CMV RNA2及RNA3上不同的基因序列進行反向重複序列 (inverted-repeat, IR) 構築，結果以2b基因為目標片段所設計的構築能提供最佳的抗病表現。Di Nicola-Negri等人⁽¹²⁾以李痘癩病毒 (*Plum pox virus*, PPV)上P1基因及HC-Pro基因為IR構築的目標片段在圓葉菸草上構築轉基因抗性，發現抗病效率皆可達到90%以上。本研究為首例以洋桔梗壞疽病毒 (LNV)做為防治對象，構築轉基因抗性於菸草之報告。於LNV基因體上選取四個區域作為設計反向重複序列構築的目標片段，計構築了四個轉基因載體pLNVRD5-IR、pLNVRD3-IR、pLNV3'CP-IR及pLNVMP-IR。以LNV挑戰接種R0菸草轉植株後發現pLNVRD5-IR所提供的抗病效率高達80.1%，pLNVRD3-IR為32%，pLNV3'CP-IR及pLNVMP-IR則分別為41.2%及12.5%。以結果來看，四個轉基因構築在抗病效率上有程度上的差異，pLNVRD5-IR明顯優於pLNVRD3-IR，推測在LNV複製過程中RdRp前半端 (5'端)的重要性大於後半端 (3'端)。在四個構築中以pLNVRD5-IR的效率最高，表示LNV感染圓葉菸草的過程中，RNA複製酶相較於鞘蛋白與移動蛋白對感染過程的影響較大，由於pLNVRD5-IR的轉基因菸草中有產生針對病毒複製酶基因的siRNA，在病毒複製的初期引發PTGS阻止LNV繼續在寄主體內感染，因此pLNVRD5-IR的轉基因菸草較其他構築對LNV有較高之抗性。pLNVMP-IR的目標片段中包含靜默抑制子p19基因之序列，但其抗病效果與上述針對CMV 2b、PPV P1和HC-Pro等靜默抑制子基因序列之轉基因菸草相比有明顯落差，是否pLNVMP-IR無法有效抑制LNV之靜默抑制子的作用與pLNVMP-IR之siRNA表現量有關，需待進一步測試。實驗中pLNVRD5-IR的轉基因菸草中有兩個株系 pLNVRD5-IR-8與pLNVRD5-IR-10在經過挑戰接種LNV後分別於第9及24天於接種葉上產生典型LNV感染的壞疽及萎凋病徵，而新生系統葉片中則有病徵恢復(recovery)之情形，但在挑戰接種30天後以ELISA檢測系統葉並沒有於葉片中檢測出LNV，與Lindbo等人⁽²¹⁾的報告中，轉基因菸草在接種菸草蝕刻病毒 (*Tobacco etch virus*, TEV)後，接種葉出現延遲病徵且新葉無病毒 (virus-free)有相似的現象。儘管系統葉上並沒有觀察到典型病徵，但有葉綠素不足以致葉面白化之情形。挑戰接種LNV之後，為何在pLNVRD5-IR-8與pLNVRD5-IR-10轉基因植株上僅接種葉出現病徵，卻沒有出現頂芽壞死的原因尚待釐清。而pLNVRD5-IR-8和pLNVRD5-IR-10分別於接種後第9天和第24天出現病徵，但在接種30天後的ELISA檢測上與高度抗病轉植株的ELISA結果相同，皆沒有測出LNV，推測該恢復的現象與植株內沒有檢測出LNV病毒存在有關。

轉基因作物 (Genetically modified crops, GM crops)已漸漸成為全世界重要的糧食作物生產來源，由於可以調控生長特性及性狀，並且具備有效提高產量的優點，大幅降低化學藥劑的使用及肥料的用量，減少許多生產成本⁽³⁰⁾。而利用植物基因轉殖技術對觀賞植物進行性狀改變的研究僅侷限於部分種類，因不同觀賞植物的商品價值、適用性狀、轉殖過程中所需要的條件

不盡相同，故目前轉基因觀賞植物並不普及⁽⁴⁾。但也有研究團隊針對不同需求開發出新的花卉品種，如改變花色⁽²³⁾、增加香氣⁽³²⁾、逆境耐受性⁽³⁷⁾等等。除了上述的性狀之外，抗病能力也是需要重視的特性之一，在蝴蝶蘭屬及石斛蘭屬的植物上已有報告導入蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)的鞘蛋白基因及部分序列可提供植株對病毒之抗性^(7, 19)。然而社會大眾對GM產品仍抱有疑慮，例如超級雜草 (superweed)，優勢基因經由近源種雜交後被雜草獲得，成為具有競爭優勢的雜草，會對生態系與該轉基因作物的生產造成很大的衝擊⁽²⁶⁾，進而演變成環境問題。另外，還有轉基因植物所表現的蛋白毒性、過敏性及篩選標誌等問題⁽²²⁾。目前國際間針對轉基因作物已訂定了嚴謹而周全的法規，加以規範轉基因作物的生產、種植及販售，來保障生產者與消費者的權益⁽⁴⁾。本研究的主軸是藉由反向重複序列構築誘導植物體內PTGS反應，為RNA誘導抗性(RNA-mediated resistance)的策略，其中所使用的基因片段皆不會表現出病毒蛋白，因此可以避免前述的蛋白毒性問題，篩選標誌基因可經由marker-free技術⁽³⁹⁾來解決。

洋桔梗的轉殖技術歷經了 *Agrobacterium rhizogenes*⁽¹³⁾及粒子槍轟擊技術(bombardment)⁽²⁸⁾的階段，現今已改用 *A. tumefaciens*⁽²⁹⁾作為協助導入外源基因相關實驗的工具。不過根據目前為止的研究報告，組織培養狀態下的洋桔梗再生比率 (regeneration rate)偏低，且培植體形成癒傷組織後順利分化成芽體的機會僅17%⁽⁴⁰⁾。再加上組織培養中常會出現偽陽性 (false positive)的轉植株，能獲取目標轉植株的機會不大。本實驗中使用反向重複序列 (inverted-repeat)的構築策略，考慮在低芽體再生率的轉基因植物建構轉基因抗病性的一個選項⁽¹¹⁾。利用IR所提供的高度抗病效率，有助於提高挑選到抗病洋桔梗轉植株的機會。

引用文獻

1. Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
2. An, Y. Q., McDowell, J. M., Huang, S., McKinney, E. C., Chambliss, S., and Meagher, R. B. 1996. Strong, constitutive expression of *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 10: 107-121.
3. Brodersen, P., and Voinnet, O. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22: 268-280.
4. Chandler, S. F., and Sanchez, C. 2012. Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnol. J.* 10: 891-903.
5. Chang, C. H. 2003. Complete Genome Sequence and Genetic Organization of *Lisianthus Necrosis Virus*. Master thesis.

Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 70pp. (in Chinese)

6. Chang, Y. S. 2007. Identification and Characterization of a Calla Lily-Infecting Isolate of Lisianthus Necrosis Virus. Master thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 53pp. (in Chinese)
7. Chang, C., Chen, Y. C., Hsu, Y. H., Wu, J. T., Hu, C. C., Chang, W. C. and Lin, N. S. 2005. Transgenic resistance to *Cymbidium mosaic virus* in *Dendrobium* expressing the viral capsid protein gene. *Transgenic Res.* 14: 41-46.
8. Chen, C.C., Chen, Y.K., and Hsu, H.T. 2000. Characterization of a virus infecting lisianthus. *Plant Dis.* 84: 506-509.
9. Chen, Y.K., Chao, H.Y., Shih, P.J., Tsai, W.Y., and Cha, C.H. 2016. First report of *Papaya leaf curl Guangdong virus* infecting lisianthus in Taiwan. *Plant Dis.* 100: 2342.
10. Chen, Y. K., Jan, F.J., Chen, C. C., and Hsu, H. T. 2006. A new natural host of *Lisianthus necrosis virus* in Taiwan. *Plant Dis.* 90: 1112.
11. Chen, Y.K., Lohuis, D., Goldbach, R., and Prins, M. 2004. High frequency induction of RNA-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus* using inverted repeat constructs. *Mol. Breed.* 14: 215-226.
12. Di Nicola-Negri, E., Brunetti, A., Tavazza, M., and Ilardi, V. 2005. Hairpin RNA-mediated silencing of *Plum pox virus* P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Res.* 14: 989-994.
13. Handa, T. 1992. Regeneration and characterization of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum*) plant transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 9: 10-14.
14. Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
15. Iwaki, M., Hanada, K., Maria, E. R. A., and Onogi, S. 1987. *Lisianthus necrosis virus*, a new necrovirus from *Eustoma russellianum*. *Phytopathology* 77: 867-870.
16. Iwaki, M., Maria, E.R.A., Hanada, K., Onogi, S. and Zenbayashi, R. 1985. Three viruses occurred in lisianthus plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 52: 355.
17. King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., and Lefkowitz, E. J. 2012. *Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam. 1327pp.
18. Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55: 53-62.
19. Liao, L. J., Pan, I. C., Chan, Y. L., Hsu, Y. H., Chen, W. H. and Chan, M. T. 2004. Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of *Cymbidium mosaic virus* is a manifestation of RNA-mediated resistance. *Mol. Breed.* 13: 229-242.
20. Lindbo, J.A., and Dougherty, W. G. 1992. Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistance phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 144-153.
21. Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., and Dougherty, W. G. 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.
22. Nordlee, J. A., Taylor, S. L., Townsend, J. a., Thomsa, L. A., and Bush, R.K. 1996. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *New Engl. J. Med.* 334: 688-692.
23. Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi, T. and Tanaka, Y. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 11075-11080.
24. Powell, P.A., Stark, D.M., Sanders, P.R., and Beachy, R.N. 1989. Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6949-6952.
25. Sanford, J. C., and Johnston, S. A. 1985. The concept of parasite-derived resistance - Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theoret. Biol.* 113: 395-405.
26. Saxena, D., Flores, S., and Stotzky, G. 1999. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature* 402: 480.
27. Schouten, A., Roosien, J., de Boer, J. M., Wilmlink, A., Rosso, M. N., Bosch, D., Stiekema, W. J., Gommers, F. J., Bakker, J., and Schots, A. 1997. Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol. *FEBS Letters* 415: 235-241.
28. Semeria, L., Vaira, A. M., Accotto, G. P., and Allavena, A. 1995. Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* Griseb. by microinjectile bombardment. *Euphytica* 85: 125-130.
29. Semeria, L., Ruffoni, B., Rabaglio, M., Genga, A., Vaira, A. M., Accotto, G. P., and Allavena, A. 1996. Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 47: 67-72.
30. Singh, O. V., Ghai, S., Paul, D., and Jain, R. K. 2006. Genetically modified crops: success, safety assessment, and public concern. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 598-607.
31. Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., and Waterhouse, P. M. 2000. Total silencing by

- intron spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320.
32. Spitzer-Rimon, B., Marheva, E., Barkal, O., Marton, I., Edelbaum, O., Masci, T., Naveen-Kumar, P., Shklamann, E., Ovadis, M. and Vainstein, A. 2010. *EOBII*, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia. *Plant Cell* 22: 1961-1976.
 33. Tougou, M., Furutani, N., Yamagishi, N., Shizukawa, Y., Takahata, Y., and Hidaka, S. 2006. Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of *Soybean dwarf virus*. *Plant Cell Rep.* 25: 1213-1218.
 34. van Engelen, F. A., Schouten, A., Molthoff, J. W., Roosien, J., Salinas, J., Dirkse, W. G., Schots, A., Bakker, J., Gommers, F. J., Jongsma, M. A., Bosch, D., and Stiekema, W. J. 1994. Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 26: 1701-1710.
 35. Voinnet, O. 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Rev. Genet.* 6: 206-220.
 36. Wang, M. B., Abbott, D. C., and Waterhouse, P. M. 2000. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to *Barley yellow dwarf virus*. *Mol. Plant Pathol.* 1: 347-356.
 37. Warner, R. 2011. Genetic approaches to improve cold tolerance of petunia. *Floricult. Int.* 15-16.
 38. Waterhouse, P. M., Graham, M. W., and Wang, M. B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 13959-13964.
 39. Yang, C. F., Chen, K. C., Cheng, Y. H., Raja, J. A., Huang, Y. L., Chien, W. C., and Yeh, S. D. 2014. Generation of marker-free transgenic plants concurrently resistant to a DNA *Geminivirus* and a RNA *Tospovirus*. *Sci. Rep.* 4: 5717.
 40. Zaccari, M., Lewinsohn, E., and Pichersky, E. 2001. Modifying lisianthus traits by genetic engineering. *Acta Hort.* 552: 137-142.
 41. Zhang, Z. Y., Wang, Y. G., Shen, X. J., Li, L., Zhou, S. F., Li, W. C., and Fu, F. L. 2013. RNA interference-mediated resistance to *Maize dwarf mosaic virus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 113: 571-578.

ABSTRACT

Lin, Y.-W. and Chen, Y.-K. 2016. Preliminary studies on constructing transgenic resistance against Lisianthus necrosis virus. *J. Plant Med.* 58(3_4): 151-160.

Lisianthus [*Eustoma russellianum* (Don.) Griseb.] is an important ornamental crop in the cut flower industry worldwide. However, there are several viral diseases interfere lisianthus production in Taiwan, especially Lisianthus necrosis virus (LNV), which is probably the most devastating one to lisianthus. In order to provide lisianthus with virus resistance, the effective strategies of post-transcriptional gene silencing (PTGS) was chosen. Among those, the approach of using inverted-repeat (IR) constructs has been shown to have better efficacy. The cDNA fragments derived from LNV genes of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), coat protein (CP) and movement protein (MP) were cloned into the binary vector pBIN in the form of IR and already introduced into *Nicotiana benthamiana* and *Eustoma russellianum* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) to generate transgenic tobacco and lisianthus potentially resistant to LNV. All four IR constructs, i.e. pLNVRD5-IR, pLNVRD3-IR, pLNV3'CP-IR, and pLNVMP-IR, conferred transgenic resistance to tobacco plants and the pLNVRD5-IR conferred the best efficiency among the four constructs. The resistance ratio in R₀ tobacco of constructs pLNVRD5-IR, pLNVRD3-IR, pLNV3'CP-IR and pLNVMP-IR are 80.1%, 32%, 41.2% and 12.5%, respectively.

Keywords: *Eustoma russellianum*, inverted repeat sequences, Lisianthus necrosis virus, *Nicotiana benthamiana*, transgenic resistance.

謝 辭

本文為第一作者碩士論文之部分內容。研究經費由國立中興大學及農委會動植物防疫檢疫局提供，謹此一併致謝。