

國立臺灣大學植物病理與微生物學系
九十八學年度第一學期專題討論
碩博士班研究生論文計畫發表會



國立臺灣大學
植物病理與微生物學系

國立臺灣大學植物病理與微生物學系
九十八學年度第一學期專題討論
碩博士班研究生論文計畫發表會議程

日期與地點	演講者	題 目	編號
9/17 (9:10-12:00) 一號館 R308 教室	李勇賜 (9:10-9:35)	感染火龍果之 potexvirus 之選殖與應用	A-1 (p1)
	洪煦華 (9:35-10:00)	柑橘破葉病毒的感染性選殖株的構築	A-2 (p3)
	王崇名 (10:00-10:25)	Integrin-dependent FAK activation and its signaling--Akt activation	A-3 (p5)
	休息 20 分鐘		
	姚玟玲 (10:45-11:10)	FAK於神經發育中所扮演的角色研究	A-4 (p7)
	曹哲維 (11:10-11:35)	人工栽培介質對室內植物淨污能力影響之研究	A-5 (p8)
	陳均岳 (11:35-12:00)	蔥韭銹病非農藥防治及流行病學之研究	A-6 (p10)

日期與地點	演講者	題 目	編號
9/19 (9:00-16:35) 普通教室 R102 教室	陳冷伶 (9:00-9:25)	The Study and Application of Plasmid pPLY of Periwinkle Leaf Yellowing Phytoplasma	B-1 (p13)
	蘇意婷 (9:25-9:50)	日日春被植物菌質體感染後花色花器發育相關基因之研究	B-2 (p15)
	馮雅智 (9:50-10:15)	Evolution and further characterization of HLBB strains in biological and molecular natures	B-3 (p17)
	休息 20 分鐘		
	林觀蘋 (10:35-11:00)	Cloning and characterization of zebrafish FAK genes, zFAK1a and zFAK1b, and their roles in zebrafish development	B-4 (p19)
	姚雋儀 (11:00-11:25)	菸草微綠嵌紋病毒載體之構築與研究	B-5 (p21)
	張馨元 (11:25-11:50)	Detection and characterization of methylation in <i>Banana bunchy top virus</i>	B-6 (p23)
	黃偲佳 (11:50-12:15)	發展偵測香蕉條紋病毒六個品系之快速檢測方法與臺灣香蕉條紋病之調查	B-7 (p25)
	午餐時間		
	吳昭蓉 (13:30-13:55)	煙草嵌紋病毒對寄主阿拉伯芥基因 <i>pap85</i> 調控機制之探討	C-1 (p27)
	楊瑞春 (13:55-14:20)	木瓜輪點病毒木瓜型感染性選殖株之構築及病徵決定因子之分析	C-2 (p29)
	林之煦 (14:20-14:45)	Characterizing the involvement and mechanism of the small RNA fragments of CEVd in pathogenesis	C-3 (p31)
	甘佳正 (14:45-15:10)	Identification and characterization of a Nep1-like protein in anthracnose fungus <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	C-4 (p33)
	休息 10 分鐘		
	王國馨 (15:20-15:45)	Study of the mechanism underlying phosphonate-induced plant resistance	C-5 (p35)
	蔡昇宏 (15:45-16:10)	An assessment on the potential of using fungi as a biocontrol against <i>Aulacaspis yasumatsui</i> Takagi	C-6 (p37)
	林斌 (16:10-16:35)	基轉作物黑色素生合成基因以提昇其逆境抗性	C-7 (p38)
	總討論 (主持人：陳昭瑩教授)		

感染火龍果之 potexvirus 之選殖與應用

李勇賜

R97633010

(指導教授：張雅君)

摘要

紅龍果(pitaya)屬於仙人掌科(Cactaceae)三角柱屬(*Hylocereus* spp.)的攀緣性肉質植物，為近年來新興栽種之熱帶果樹之一。由 2008 年農糧署統計，台灣紅龍果栽種面積將近七百六十四公頃，年產量達一萬五千噸。根據文獻報導指出，目前有四屬十種的植物病毒會感染仙人掌，其中 *Potexvirus* 屬的仙人掌 X 病毒(*Cactus virus X*, CVX) 是國內已知唯一感染紅龍果的病毒，且普遍存在於栽種的紅龍果植株中。本實驗室從台灣的火龍果園中分離出兩種 potexvirus 病毒分離株，稱為 P39 及 P37，經由分子選殖和序列分析，發現其序列與感染仙人掌科的 potexvirus 相似。P39 分離株與前人報導過之蟹爪蘭 X 病毒(*Zygocactus virus X*, ZVX) 相似度高達 96%，故將其命名為 ZVX-P39。另一 P37 分離株應為一種未曾報導過，可感染紅龍果的新 potexvirus，因此將分離株 P37 命名為紅龍果 X 病毒(*Pitaya virus X*, PiVX)。本論文研究分成兩個部份，第一部份針對紅龍果 potexvirus 之生物特性進行分析，研發快速檢測方法，以及進行田間病害調查。由於紅龍果栽培方式簡單、耐病蟲害及不良環境，受病毒感染後病徵輕微，而且病毒於整顆果實皆有分佈，第二部份研究針對從田間分離的火龍果病毒 CVX-NTU 及 PiVX-P37 進行感染性 cDNA 選殖株之構築，並研發成表現載體。藉由 potexvirus 高複製量、系統性感染、機械接種簡便，能在接種後數天內表現高量的目標基因之特性，透過不同建構方法表現腸病毒之抗原。將 CVX 或 PiVX 病毒載體接種寄主植物後，以病毒感染之植物餵食實驗動物，測試是否能引起實驗動物之免疫反應，以供未來改良為口服疫苗的依據。

關鍵詞：

Potexvirus、pitaya、*Cactus virus X*、disease survey、virus vector、oral vaccine

參考文獻：

1. 毛青樺。2008。蟹爪蘭 X 病毒與紅龍果 X 病毒之分子特性與偵測。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
2. 呂有其。2007。仙人掌病毒 X 新分離株之特性分析與感染性選殖株之構築。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
3. 劉命如、洪建龍、劉瑞芬。2004。引起紅龍果斑駁病微之 *Cactus virus X* 的鑑定與免疫檢測。植病會刊 13：27-34。
4. 劉命如。2000。紅龍果嵌紋病毒生物特性及全釀度核酸序列之研究。國立台灣大學植物病理研究所碩士論文。
5. Chen, H. F., Chang, M. H., Chiang, B. L., and Jeng, S. T. 2006. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine* 24: 2944-2951.
6. Koenig, R., Lesemann, D. E., Loss, S., Engelmann, J., Commandeur, U., Deml, G., Schiemann, J., Aust, H., and Burgermeister, W. 2006. *Zygocactus virus X*-based expression vectors and formation of rod-shaped virus-like particles in plants by the expressed coat proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* and *Soil-borne cereal mosaic virus*. *Journal of General Virology* 87: 439-443.
7. Koenig, R., Pleij, C. W. A., Loss, S., Burgermeister, W., Aust, H., and Schiemann, J. 2004. Molecular characterization of potexviruses isolated from three different genera in the family Cactaceae. *Archives of Virology* 149: 903-914.
8. Liou, M. R., Chen, Y. R., and Liou, R. F. 2004. Complete nucleotide sequence and genome organization of a *Cactus virus X* strain from *Hylocereus undatus* (Cactaceae). *Archives of Virology* 149: 1037-1043.
9. Santi, L., Batchelor, L., Huang, Z., Hjelm, B., Kilbourne, J., Arntzen, C. J., Chen, Q., and Mason H. S. 2008. An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine* 26: 1846-1854.
10. Uhde, K., Fischer, R., and Commandeur U. 2005. Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of *Potato virus X* particles. *Archives of Virology* 150: 327-340.

柑橘破葉病毒的感染性選殖株的構築

洪煦華

R97633006

(指導教授:洪挺軒)

摘要

由柑橘破葉病毒(*Citrus tatter leaf virus*, CTLV)所引起的柑橘破葉病是柑橘重要的系統性病害之一。CTLV 可感染多種柑桔品種、栽培種及雜交種，但多數無病徵表現，其中 CTLV 在 *Citrus excelsa* 中會在葉片上造成褪色斑點、萎縮、畸形、不整形葉、鋸齒狀邊緣等病徵，因此稱為破葉病 (Wallace and Drake, 1962)。CTLV 系統複雜，在不同地區與不同柑橘品種上病害表現迥異，防疫方向掌握不易；而病毒基因體的相關研究迄今仍相當有限，更無法精確釐清其病原性。有鑑於此，本論文擬嘗試構築人工感染性選殖病毒株，做為病毒基因體分析與病原性探討的基礎。從田間罹病植株上採得病芽，經嫁接到指示植物 Rusk 作生物檢定而產生典型 CTLV 病徵者，再將其嫁接至柑桔寄主上進行病毒繁殖，以作為病毒純化的來源。利用 TRIzol Reagent 法抽取植物組織中的 total RNAs，以及 two-step RT-PCR 增幅來構築 CTLV 全長 cDNA 選殖株，再以胞外轉錄(*in vitro* transcription)方式合成純系、完整的病毒基因體 RNA，進行白藜的接種試驗，若接種順利可再嘗試接種至柑桔種苗。目前已成功增幅出兩段片段，分別為 5060 bp 及 1896 bp。也進一步將 5'端接上 T3 promoter；序列末端 3'端接上 poly(A) tail 及限制酶切位。未來待兩段黏合後即可送入質體內，進行 RNA 之 *in vitro* transcription 來合成人工選殖病毒株，之後即可將人工 RNA 接種至寄主植物上觀察其感染力。

關鍵詞:

Citrus tatter leaf virus，infectious clones

參考文獻：

1. 林育萱.2004.柑桔破葉病毒系統之鑑別與快速偵測法之研發. 國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文.p1-75.
2. 劉亭君.2008.木瓜輪點病毒的感染性選殖株之構築及不同系統間的基因體比較. 國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文.p1-66.
3. 蔡美珍.1986.柑桔破葉病病毒之特性.國立台灣大學植物病蟲害研究所碩士論文. p1-89.
4. Ahlquist, P. and Janda, M., 1984. cDNA cloning and *in vitro* transcription of the complete *Brome mosaic virus* genome. Mol. Cell. Biol. 4:2876-2882.
5. Boyer, J. C. and Haenni, A. L. 1994. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA virus. Virology 198:415-426.
6. Calavan, E. C., D. W. Christiansen, C. N. Roistacher. 1963. Symptoms associated with tatter-leaf virus infection of Troyer citrange rootstock. Plant Dis. Rep. 47:971-975.
7. Garnsey, S.M., Jones, J.W.1968. Relationship of symptoms to the presence of tatter-leaf virus in several citrus hosts. Virol. p137.
8. Hung, T. H., Wu, M.L., Su, H. J.1999. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. J. Phytopathol. 147:599-604.
9. Hung, T. H., Wu, M.L., Su, H. J. 2000. A rapid method based on the one-step RT-PCR technique for detection of different strains of *Citrus tristeza virus*. J. Phytopathol. 148:469-475.
10. Ohira, K.,S.Namba, M.Rozanov, T. Kusumi, T.Tsuchizaki.1995.Complete sequence of an infectious full-length cDNA clones of citrus tatter leaf capillovirus: comparative sequence analysis of capillovirus genomes. Gen. Virol. 76:2305-2309.
11. Tatineni, S., Afunian, M. R., Hilf, M.E., Gowda,S., Dawson,W.O., and Garnsey, S. M. 2008. Molecular characterization of *Citrus tatter leaf virus* historically associated with meyer lemon trees: complete genome sequence and development of biologically active *in vitro* transcripts. Virol. 99:423-431.

Integrin-dependent FAK activation and its signaling – Akt activation

王崇名

R97633021

(指導教授：沈湯龍)

摘 要

Integrins 是一種於細胞膜上的受體，可與細胞外的基質(extracellular matrix) 進行交互作用，調控細胞的黏著、移動和生長等細胞功能。Focal adhesion kinase (FAK) 是一種分子量 125 kDa 的酪胺酸激酶(tyrosine kinase)，經由與 talin 和 paxillin 等 focal adhesion complex 的蛋白質間交互作用，在 integrin 於細胞內部的一端形成聚合，扮演 integrin 的細胞訊息傳遞中重要的訊息分子。protein kinase B(Akt) 為一控制細胞增生、存活、細胞凋亡等重要功能的蛋白質，許多細胞外之環境因子會促進 Akt 活化。然而對於 FAK 如何調控 Akt 的活性並未被詳細研究，故此研究針對 FAK 的活化對於 Akt 的活性作用進行研究，並探討其對眼角膜上皮細胞增生與傷口癒合所扮演的角色。首先藉由人類眼角膜上皮細胞(HCECs)來確認 FAK 活化與 AKT 活性關係，以 western 確認在 HCECs 中活化的 FAK 會去影響 AKT 的活化，接下來再 over express 或 knockdown FAK 於 HCECs 中，探討 FAK 和 Akt 在細胞移動和增殖的影響及功能。另一部分則以基因剔除和基因轉殖小鼠做實驗，包含於眼角膜專一性剔除 FAK 的小鼠和 Akt 基因剔除小鼠來探討 FAK 與 Akt 在眼角膜上皮細胞增生與傷口癒合所扮演的角色。

参考文献：

1. Hong Xia, Richard Seonghun Nho, Judy Kahm, Jill Kleidon, and Craig A. Henke. Focal Adhesion Kinase Is Upstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt in Regulating Fibroblast Survival in Response to Contraction of Type I Collagen Matrices via β_1 Integrin Viability Signaling Pathway. *Journal of biological chemistry*. 2004.Vol. 279. p.33024–33034.
2. Lin Hao Li , Li Jun Wu , Shin ichi Tashiro , Satoshi Onodera ,Fumiaki Uchiumi , Takashi Ikejima. The roles of Akt and MAPK family members in silymarin protection against UV-induced A375-S2 cell apoptosis. *International Immunopharmacology* 6 (2006) 190–197.
3. Shimon Reif, Alon Lang, Jeffery N. Lindquist, Yutaka Yata, Erwin Gabrilove, Andrew Scanga, David A. Brenner, and Richard A. Rippe. The Role of Focal Adhesion Kinase-Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Signaling in Hepatic Stellate Cell Proliferation and Type I Collagen Expression. *Journal of biological chemistry*. 2003.Vol. 278. p. 8083–8090.
4. Teet Velling, Stina Nilsson, Anne Stefansson & Staffan Johansson. β_1 -Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO reports*. 2004. Vol 5 .No 9. p.901-905.

FAK 於神經發育中所扮演的角色研究

姚玟伶

R97633015

(指導教授：沈湯龍)

摘要

FAK (Focal adhesion kinase) 為一 protein tyrosine kinase，在一般細胞中，其主要和細胞的遷移及生長能力有關。在哺乳類動物中，FAK 於腦部具有相當高的表現量，且富含於神經細胞中，但 FAK 在神經系統的發育過程中，所扮演的角色功能為何，則尚不清楚。因此，我們將探討 FAK 在神經分化上，是否有參與並且了解其功能。我們使用了一可被 Nerve growth factor (NGF) 所誘導分化成神經細胞形態的細胞株，PC12，做為研究的 *in vitro* model。藉由 Adenovirus 表現不同的 FAK 突變株以及利用 FAK shRNA 的方式來 knockdown 內生性的 FAK，皆可使我們初步了解 FAK 於神經分化過程之角色；而我們亦使用了 conditional gene targeting 的方式，基於 cre/loxP 系統，利用 F1B-Cre transgenic mice 與 FAK floxed mice 進行配對，得到 FAK 於腦部 knockout 的小鼠作為 *in vivo* model，用以檢視 FAK 於神經發育上之角色扮演。我們希冀此研究除了提供 FAK 在神經分化過程中的定位更進一步的了解之外，也期望可作為神經性退化疾病及未來神經幹細胞的研究基礎。

人工栽培介質對室內植物淨污能力影響之研究

曹哲維

R97633020

(指導教授：孫岩章)

摘 要

室內環境由於通風不良加上建築材料與其他因素，時常造成某些污染物長時間累積，形成所謂的室內空氣污染，並對人體健康產生危害，所以如何解決室內空氣污染便是一研究之重點。利用植物淨化室內空氣污染，已證實具有良好的功效，兼具美觀、自然等多項優點，可看出未來發展之潛力。先前的研究指出，植物可吸收多種氣態污染物，其沈降速率則依據植物種類而有所差異，一部分的研究針對植物葉部的淨污能力，發現多半和葉面積大小、氣孔的開閉、葉肉組織和表皮的構造有關，由於污染物進入植物葉部為被動式的擴散，故污染物的沈降速率便和其葉部構造有密切之關係；另一部分則針對於栽培介質來吸附空氣污染，並利用植物根部與微生物降解污染物，但兩者之關聯性卻依然未有明確之答案。本研究之內容主要在於釐清植物在淨化室內空氣污染的過程中與栽培介質間的關係，藉由比較其葉部、栽培介質與整體之淨污能力，期望能發現其中之關連性，而室內植物多半使用人工栽培介質，故這些人工栽培介質對於污染物的吸附能力也是一項試驗內容，其中也包括了栽培介質中微生物所扮演之角色。目前室內外的植生牆亦為一項熱門研究，在擁擠的城市中，想種樹綠化並不容易，植生牆利用垂直的空間，不僅擁有更大的面積來吸收二氧化碳與其他室內外空氣污染物，故希望能夠利用植生牆的優點與特性開發出更有效率之淨污策略，其構想是將活性炭、矽藻土、矽膠、陶粒與竹炭等吸附材質添加於植物的栽培介質當中，利用其吸附污染物的能力，包括了污染物的吸收途徑與植物本身和微生物對於這些吸附污染物的降解能力，找出最佳淨化室內空氣污染之組合，提升室內空氣淨化的效率，兼具室內環保與綠化之目的。

關鍵詞：

Indoor air , volatile organic compounds (VOCs), deposition velocity, phytoremediation.

參考文獻:

1. 陳彥宇。 2007。 常見室內植物對甲醛及二氧化碳之吸收及反應。 國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
2. 楊玉婷。 2007。 常見室內植物對苯之吸收及反應。 國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
Wood, R. A., Orwell, R., Tarran, J., Torpy, F., and Burchett, M. 2002. Potted-plant/growth media interactions and capacities in removal of volatiles from indoor air. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 77(1):120–129.
3. Wood, R. A., Burchett, M. D., Alquezar, R., Orwell, R. L., Tarran, J., and Torpy, F. 2006. The potted-plant microcosm substantially reduces indoor air VOC pollution: I. Office field-study. *Water Air and Soil Pollution* 175 (1-4):163-180.
4. Orwell, R. L., Wood, R. A., Burchett, M. D., Tarran, J., and Torpy, F. 2006. The potted-plant microcosm substantially reduces indoor air VOC pollution: II. Laboratory study. *Water Air and Soil Pollution* 177 (1-4):59-80.
5. Sawada, A., Oyabu, T., Yoshida, T., and Nagai, H. 2003. Removing capability for formaldehyde of plant growing in an activated carbon pot. *SICE 2003 Annual Conference in Fukui*. 3:2476–2481.
6. Wolverton, B. C., Johnson, A., and Bounds, K. 1989. *Interior Landscape Plants for Indoor Air Pollution Abatement, Final Report, September*. N. A. S. A. Pages 30.
7. Wolverton, B. C., and Wolverton, J. D. 1993. Plants and soil microorganisms: removal of formaldehyde, xylene, and ammonia from the indoor environment. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences* 38(2):11-15.

蔥韭銹病非農藥防治及流行病學之研究

陳均岳

R97633001

(指導教授：孫岩章)

摘 要

蔥(*Allium fistulosum*)及韭(*Allium tuberosum*)為蔥科蔥屬植物，原產於中國，早年由大陸移民者傳入國內，除營養豐富之外在料理上能收畫龍點睛之效，從民國 88 年至 97 年蔥和韭的種植面積分別維持在 5000 公頃及 1000 公頃左右，屬於國人飲食中不可或缺的香辛料作物。*Puccinia allii* 為引起蔥屬作物銹病之病原，為蔥屬作物生產上之重要病害，在全世界的蔥、韭、蒜、洋蔥等作物生產上造成嚴重的經濟損失。在台灣從九月下旬開始造成危害，直到翌年 5 月天氣開始回溫才趨緩。病原起初在葉表面上形成桔色橢圓形之隆起病斑，此為病原菌之夏孢子堆，其上所生的夏孢子隨風、雨水傳播，造成重複感染，是流行的主因。發病嚴重時，葉片為黃色粉狀物所覆蓋，繼之乾枯倒伏，若不採取適當防治措施，經濟損失可以達到三分之一以上。蔥韭銹病目前最主要仰賴的是以農藥進行化學防治，作物生長期間銹病一旦發生，農民約每隔 7 天噴藥一次，嚴重發生時約每隔 3~5 天噴藥一次。植物保護手冊推薦，自發病初期開始，每 7~10 天用藥一次，由於農藥使用頻繁除導致農藥殘留疑慮外，不適當的化學防治措施亦浪費用藥且導致抗藥性發生。非農藥防治法則為有機農業及無毒農業的選項；本研究擬測試三種重碳酸鹽類、窄域油、苦楝油、合成植物營養液、生物防治菌發酵產物等，進行田間以及溫室蔥韭銹病之防治試驗，並與植保手冊之推薦藥劑進行藥效比較。同時在田間以及病區進行蔥韭流行病學模式的建立，以期能夠在病害發生前發揮預警之效，早期防治，使防治措施達到用量最少，效果最好的目標，兼顧食品安全及經濟收益。希望本研究能夠在國內蔥韭銹病防治上，減少慣行農藥之使用，並增進防治之效益。

關鍵詞：

蔥韭銹病、*Puccinia allii*、非農藥防治、重碳酸鹽、生物防治菌發酵產物、流行病學

參考文獻:

1. 柯勇。2005。蔥病害。台灣農家要覽，農作篇三。行政院農業委員會。台北。165-168 頁。
2. 郭孚耀。2005。韭。台灣農家要覽，農作篇二。行政院農業委員會。台北。353-358 頁。
3. 楊宏瑛。2005。蔥。台灣農家要覽，農作篇二。行政院農業委員會。台北。345-348 頁。
4. 農業統計年報。2008。行政院農業委員會農糧署。48-51 頁。
5. Anikster, Y., L.J. Szabo, T. Eilam, J. Manisterski, S.T. Koike, and W.R. Bushnell. 2004. Morphology, life cycle biology, and DNA sequence analysis of rust fungi on garlic and chives from California. *Phytopathology* 94:569-577.
6. Beckett, A., L. Houston, and L.C. Frost. 1992. NEW HOST RECORDS FOR PUCCINIA-ALLII RUD. *Plant Pathology* 41:83-85.
7. Clarkson, J.P., R. Kennedy, K. Phelps, J. Davies, and J. Bowtell. 1997. Quantifying the effect of reduced doses of propiconazole (Tilt) and initial disease incidence on leek rust development. *Plant Pathology* 46:952-963.
8. Furuya, H., H. Takanashi, S. Fuji, Y. Nagai, and H. Naito. 2009. Modeling Infection of Spring Onion by *Puccinia allii* in Response to Temperature and Leaf Wetness. *Phytopathology* 99:951-956.
9. Huang, J.W. 1992. INTEGRATED MANAGEMENT OF VEGETABLE SEEDLING PESTS WITH A FORMULATED PLANT NUTRITION. *Plant Protection Bulletin (Taichung)* 34:54-63.
10. Jennings, D.M., B.V. Fordlloyd, and G.M. Butler. 1989. AN ANILINE BLUE SQUASH TECHNIQUE FOR OBSERVATION OF UREDINIOSPORE GERM PORES. *Mycol. Res.* 92:230-251.
11. Jennings, D.M., B.V. Fordlloyd, and G.M. Butler. 1990a. EFFECT OF PLANT-AGE, LEAF POSITION AND LEAF SEGMENT ON INFECTION OF LEEK BY LEEK RUST, PUCCINIA-ALLII. *Plant Pathology* 39:591-597.
12. Jennings, D.M., B.V. Fordlloyd, and G.M. Butler. 1990b. MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF SPORES FROM DIFFERENT ALLIUM RUST POPULATIONS. *Mycol. Res.* 94:83-93.
13. Jennings, D.M., B.V. Fordlloyd, and G.M. Butler. 1990c. RUST INFECTIONS OF SOME ALLIUM SPECIES - AN ASSESSMENT OF GERMPLASM FOR UTILIZABLE RUST RESISTANCE. *Euphytica* 49:99-109.
14. Ko, Y. and S.K. Sun. 1993. Ecological studies on the Chinese leek rust in Taiwan. *Plant Protection Bulletin (Taichung)* 35:1-13.
15. Koike, S.T., R.F. Smith, R.M. Davis, J.J. Nunez, and R.E. Voss. 2001. Characterization and control of garlic rust in California. *Plant Disease* 85:585-591.
16. Roberts, A.M. and D.R. Walters. 1988. NITROGEN ASSIMILATION AND

- METABOLISM IN RUSTED LEEK LEAVES. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32:229-235.
17. Sawada, K. 1928. Descriptive catalogue of Formosan Fungi. 4:46.
 18. Uma, N.U. and G.S. Taylor. 1986. OCCURRENCE AND MORPHOLOGY OF TELIOSPORES OF PUCCINIA-ALLII ON LEEK IN ENGLAND. *Transactions of the British Mycological Society* 87:320-323.
 19. Uma, N.U. and G.S. Taylor. 1987a. LIGHT AND SCANNING ELECTRON-MICROSCOPY OF INTERCELLULAR AND INTRACELLULAR HYPHAE OF PUCCINIA-ALLII IN LEEK. *Transactions of the British Mycological Society* 89:321-326.
 20. Uma, N.U. and G.S. Taylor. 1987b. PARASITISM OF LEEK RUST UREDINIOSPORES BY 4 FUNGI. *Transactions of the British Mycological Society* 88:335-340.
 21. Uma, N.U. and G.S. Taylor. 1991. REACTION OF LEEK CULTIVARS TO INFECTION BY PUCCINIA-ALLII. *Plant Pathology* 40:221-225.

The Study and Application of Plasmid pPLY of Periwinkle Leaf Yellowing Phytoplasma

陳冷伶

R97633024

(指導教授：林長平)

摘 要

日日春葉片黃化病 (periwinkle leaf yellowing) 是於民國 94 年 8 月由桃園縣大園鄉農民送檢之日日春病株，具有葉片黃化、簇葉、花器綠化及葉片化等病徵。本研究是利用檢測植物菌質體專一性引子對 (primer) 經由 PCR 檢測並比對序列後發現其屬於第一群植物菌質體 (16Sr I group, 又稱 aster yellows group, AYgroup)。基因體外 DNA, 又稱質體 DNA (plasmid DNA), 具有移動性 (mobility) 及可自行複製 (autonomous replication) 之特性被認為在植物病原菌之寄主專一性及致病性上扮演重要的角色。由前人之研究結果指出, 大部分質體 DNA 利用 rolling-circle (RC) 機制進行複製, 因質體 DNA 皆具有參與質體複製所需的 Rep 基因 (replication-association protein), 大部分質體 DNA 還具有 DnaG 基因 (DNA primase) 及 Ssb 基因 (single-strand binding protein) 推測此為質體以 RC 機制複製時, 穩定核酸所需之蛋白質, 目前研究證實大部分植物菌質體之質體利用 RC 機制進行複製。本研究利用已發表的第一群植物菌質體之包括翠菊黃萎病及洋蔥黃萎病質體 DNA, 其上之 Rep 基因及 Ssb 基因設計專一性引子對 (primer) 經由 PCR 反應, 取得長 2.6Kb 之片段經由 BLAST 比對分析確定為第一群植物菌質體之質體 DNA 序列, 進一步設計反向引子對 (inverse primer) 進行 PCR 反應, 取得之片段能與先前獲得之片段兩端完整連結形成環狀之結構, 總長為 3,878 bp。此質體 DNA 其上共有 5 個 ORF (open reading frame), 分別為 Rep (replication protein), Ssb (single-strand binding protein) 及 3 個未知功能的 hypothetical protein, 前人研究指出質體上之 hypothetical protein 可能為植物菌質體之膜蛋白, 並與植物菌質體之致病相關。本研究擬找出日日春葉片黃化病及本實驗室其他群的植物菌質體所含有之質體, 進一步分析其上是否帶有重複性序列或特定之序列, 可應用於菌種鑑定、病害診斷或生理小種的鑑別。

關鍵詞:

periwinkle leaf yellowing, phytoplasma, plasmid, rolling-circle, replication-association protein, DNA primase, single-strand binding protein

参考文献:

1. Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, el-D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., and Namba, S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* 9: 403–423.
2. Ishii, Y., Kakizawa, S., Hoshi, A., Maejima, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Oshima, K., and Namba, S. 2009. In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology* 155: 2058-2067.
3. Liefting, L. W., Shaw, M. E., and Kirkpatrick, B. C. 2004. Sequence analysis of two plasmids from the phytoplasma beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Microbiology* 150: 1809-1817.
4. Liefting, L. W., Andersen, M. T., Lough, T. J., and Beever, R. E. 2006. Comparative analysis of the plasmids from two isolates of “*Candidatus Phytoplasma australiense*”. *Plasmid* 56: 138-144.
5. Lin, C. L., Zhou, T., Li, H. F., Fan, Z. F., Li, Y., Piao, C. G., Tian, G. Z. 2009. Molecular characterisation of two plasmids from paulownia witches'-broom phytoplasma and detection of a plasmid-encoded protein in infected plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 123: 321-330.
6. Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Sawayanagi, T., Komoto, A., Kuboyama, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., and Namba, S. 2001. In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology* 147: 507-513.
7. Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H. Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. 2002. A plasmid from a noninsect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene* 298: 195-201.
8. Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H. Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. 2002. Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? *Microbiology* 148: 1389-1396.
9. Tran-Nguyen, L. T. T., and Gibb, K. S. 2006. Extrachromosomal DNA isolated from tomato big bud and *Candidatus Phytoplasma australiense* phytoplasma strains. *Plasmid* 56: 153-166.

日日春被植物菌質體感染後花色花器發育相關基因之 研究

蘇意婷

R97633016

(指導教授:林長平)

摘要

健康日日春被植物菌質體感染後會出現花器發育不正常、花器綠化、葉片化、枝條增生、葉片變小、生長遲緩、簇葉、植株萎凋及黃化等病徵。本研究即針對花器綠化和葉化之病徵做進一步的了解及探討。利用花生簇葉病植物菌質體 (peanut witches' broom phytoplasma, PnWB phytoplasma) 和日日春葉片黃化病植物菌質體 (periwinkle leaf yellowing phytoplasma, PLY phytoplasma) 感染模式植物日日春 (periwinkle, *Catharanthus roseus*) 後，針對日日春花色基因和花器發育相關之基因表現的差異來進行研究。研究的基因主要可分為兩大類，第一類是與花色相關之基因，花的顏色主要由類黃酮、花青素及胡蘿蔔素等化合物來決定，其中又以花青素最為重要，因此本研究即選定花青素合成路徑中所參與之酵素基因 *CHS* (chalcone synthase) 基因及 *CHI* (chalcone isomerase) 基因為目標；第二類為與花器發育相關之 B-class 基因與 *SEPALLATA* 基因，目前已知在阿拉伯芥上 B-class 基因是調控花器發育的主要基因之一，因此將 B-class 基因中的 *APETALA3* (*AP3*) 和 *PISTILLATA* (*PI*) 列為本研究的目標基因，而關於 *SEPALLATA* 基因的研究，目前已知在阿拉伯芥中 *SEPALLATA* 群之基因共有四條 (*SEP1*~*4*)，並發現此四條基因在阿拉伯芥中被突變後，花器會有葉片化的情形發生，正好與本次研究中的病徵相符合，因此也將其列為目標。本研究之目的為利用 real-time PCR 之技術來偵測健康日日春植株被植物菌質體感染後，於病徵發生的不同階段這些基因表現差異之情況，並希望藉此來探討植物菌質體與其寄主植物之間可能的交互作用及引起此些病徵可能之原因。

關鍵詞:

B-class gene, *Catharanthus roseus*, *CHS* gene, *CHI* gene, PnWB phytoplasma, PLY phytoplasma, real-time PCR and *SEPALLATA* gene

参考文献

1. Pracros, P., Renaudin, J., Eveillard, S., Mouras, A. and Hernould, M. 2005. Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:62-68
2. Christensen, N-M., Axelsen, K-B., Nicolaisen, M. and Schulz. A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci.* 10:528-535
3. Malcomber, S-T. and Kellogg, E-A. 2005 SEPALLATA gene diversification: brave new whorls. *Trends Plant Sci.* 10:427-435
4. Jagoueix-Eveillard, S., Tarenneau, F., Guolter, K., Danet, J.-L., Bové, J.-M. and Garnier, M. 2001. *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:225-233
5. Kanno, A., Nakada, M., Akita, Y. and Hirai, M. 2007. Class B gene expression and the modified ABC model in nongrass monocots. *ScientificWorldJournal* 7:268–279
6. Bai, X., Correa, V-R., Toruño, T-Y., Ammar, E-D., Kamoun, S. and Hogenhout, S-A. 2009. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 18–30
7. Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozekia, J., Hashimoto, M., Komatsua, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y. and Namba, S. 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 6416–6421
8. Nicolaisen, M. and Horvath, D-P. 2008. A branch-inducing phytoplasma in *Euphorbia pulcherrima* is associated with changes in expression of host genes. *J. Phytopathol.* 156:403–407

Evolution and further characterization of HLBB strains in biological and molecular natures

馮雅智

D97633001

(指導教授：蘇鴻基與洪挺軒)

摘要

柑橘黃龍病(Citrus huanglongbing = HLB)最早於1943在中國首次發現並以此病名發表；1947年南非以”greening”為病名報告；1951年台灣北部開始發生並被注意，推測可能由大陸傳入台灣。當時根據其引起黃化枯萎病徵而以立枯病(Likubin)稱之，爾後證實與中國的黃龍病相同。原本侷限在亞洲和非洲的黃龍病於2004年在南美洲巴西的發生，次年亦侵入美國佛羅里達州，蔓延情況日趨嚴重。截至目前世界上種植的柑桔栽培品種皆普遍發生，造成樹齡縮短，影響產量與品質，受害植物短短數年內即告枯死，為最具破壞性之柑橘病害。危害台灣地區之黃龍病菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)為亞洲型又稱耐熱型，具韌皮部局限性，寄生於維管束篩管細胞內，目前尚未能人工培養。由於台灣位於熱帶與亞熱帶之交界，特別的地理特性使得台灣柑橘品種豐富且多樣化，也因此導致黃龍病菌的跟隨演化，此菌初期只危害國內主要柑橘品種椪柑、桶柑、及柳橙，但於1971後開始感染柚類，目前台灣所有柑橘品種皆會受害。2008年由Tsai *et al.*發表利用四種不同的柑橘品種做為鑑別寄主來進行生物檢定，根據其病原性的差異鑑別出目前台灣田間之黃龍病菌系統至少有四種系統，命名為系統 I、II、III與IV；經台灣田間病菌系統的分佈調查，系統 II 為目前分佈廣之最優勢系統族群，系統 III 及 I 次之。基於這些成果，本論文研究擬再進行更深入的研究，增加可供鑑別的柑橘品種，以期能更加細分黃龍病菌的系統，而了解各個柑桔品種的耐、感病性。病菌分類系統建構完善後，再以分子層面尋找出不同系統間的分子差異性，歸納出其黃龍病菌各系統的親緣關係。由於近年來在巴西及中國皆發表了在柑桔體內黃龍病菌及Phytoplasma可能有危害的關聯性，本論文另一研究重點亦擬以菟絲子將各種Phytoplasmas感染至柑桔植株上，以了解Phytoplasma存在柑桔植株的病徵表現，以及探討其與黃龍病菌之複合感染情形。

關鍵字：柑桔黃龍病、鑑別寄主、系統、親緣性

關鍵詞：

Citrus huanglongbing; differential hosts; strains; phylogeny

參考文獻：

1. 洪挺軒. 1994. 柑橘黃龍病原擬細菌診斷用核酸探針之製備與應用於感染生態之研究. 台灣大學植物病蟲害研究所博士論文. 253 pp.
2. 洪士程. 2006. 柑橘木蝨傳播黃龍病之生態研究. 台灣大學昆蟲學研究所博士論文. 164 pp.
3. 蔡佳欣. 2007. 柑桔黃龍病之病菌系統、發病生態與化學治療. 台灣大學植物病理與微生物學研究所博士論文. 150 pp.
4. Matsumoto, T., Wang, M. C., and Su, H. J. 1961. Studies on Likubin. Pages 121-125 *In* Proceedings of 2nd conference of the international organization of citrus virologists. W. C. Price ed. University of Florida, Gainesville, 265 pp.
5. Coletta, H. D., Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., De Negri, J. D., Pompeu, J. Machado, M. A. and Muller, G..W. 2004. First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. *Plant Dis.* 88:1382.
6. Teixeira, D. C., Wulff, N. A., Martins, E. C., Kitajima, E. W., Bassanezi, R., Ayres, A. J., Eveillard, S., Saillard, C., and Bové, J. M. 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98:977-984.
7. Tsai, C.-H, T.-H. Hung and H.-J Su. 2008. Strain Identification of Citrus Huanglongbing Bacteria (HLBB) by pathogenicity characterization in Taiwan. *Bot. Stud.* 49:49-56.
8. Chen, J., Pu, X., Deng, X., Liu, S., Li, H., and Civerolo, E. 2009. A phytoplasma related to '*Candidatus Phytoplasma asteri*' detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99:236-242.

Cloning and characterization of zebrafish FAK genes, zFAK1a and zFAK1b, and their roles in zebrafish development

林靚蘋

R97633003

(指導教授：沈湯龍)

摘要

Focal adhesion kinase(FAK)為Tyrosine kinase family之一員，調控細胞的移動、生長和分化。儘管如此，FAK在生物體當中發育的角色了解的很少。由於斑馬魚(zebrafish)生活史短、可體外發育、以及透明易於觀察，是一個相當好研究遺傳和發育的模式生物，本研究提案當中我們嘗試用斑馬魚來探討FAK在斑馬魚發育中的角色。首先將斑馬魚的FAK基因 *zfak1a* (3159 bp) 及 *zfak1b* (3138 bp) 選殖出來。藉由氨基酸序列比對得知斑馬魚的FAK和雞、老鼠、及人類的序列相似度高達85%以上，顯示其是相當保守的一個蛋白。我們將這兩個斑馬魚的FAK在哺乳類細胞(NIH3T3、FAK^{-/-})當中表現，觀察是否在cell biology、biochemistry、以及function上面也有相似性。結果顯示，*zfak1a* 及 *zfak1b* 也會分布在細胞focal contact之處；*zfak1a* 也可促進細胞生長；在細胞中的磷酸化狀態也和哺乳類的FAK相似。另一方面，我們藉由Morpholino (MO) knock down 內生的 *zfak1a* 或 *zfak1b*，發現在早期8小時即開始產生phenotype，其魚體的外包現象(epiboly)延遲，並且在convergence的過程也受到抑制，使得魚體的somite變寬，進一步可能限制尾部延長。在後期20小時至48小時，魚體腦部腔室的發育出現異常，腦部及眼睛都較對照組為小且發育時間點較慢，並且有局部細胞死亡的現象產生。孵化後，觀察其游動以及對於碰觸的反應都較對照組為減少和遲緩。未來將以大量表現不同FAK的突變株進行gain of function及rescue來進一步分析這些phenotype詳細的分子機制。除了作為FAK發育及生理的模式生物，期盼以斑馬魚建立FAK在許多疾病研究和應用的平台。

參考文獻：

1. Bryan, D.C., Clarissa, A.H., Todd, A.C., Amanda, L.B., and Merrill, B.H. (2003). Activity and Distribution of Paxillin, Focal Adhesion Kinase, and Caherin Indicate Cooperative Roles during Zebrafish Morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3065-3081.
2. Claeissa, A.H., Bryan, D.C., Yi-Lin, Yan., John, P., Mark, S.C., and Merrill, B.H. (2001). Roles for Zebrafish Focal Adhesion Kinase in Notochord and Somite Morphogenesis. *Dev. Biol.* 240, 474-487.
3. David, D.S., and Satyajit, K.M. (2004). Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Current. Op. Genet. Dev.* 14, 92-101.
4. Hanks, S.K., Calalb, M.B., Harper, M.C., and Patel, S.K. (1992). Focal adhesion proteintyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc. Natl. Acad.*
5. Mei, H., Jin-kun, W., Bin, Z.Z., and Yunhui, C. (2007). Blockade of integrin h3-FAK signaling pathway activated by osteopontin inhibits neointimal formation after balloon injury. *Cardiova. Pathol.* 16, 283-290.
6. Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell. Sci.* 116, 1409-1416.
7. Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., and Parsons, J.T.(1992). Pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5192-5196.
8. Stayajit, K.M., Daniel, A.H., and David, D.S. (2005). Focal adhesion kinase in command and control of cell motility. *Nature Rev.* 6, 56-66.
9. Steven, K.H., Larisa, R., Nah-Young Shin., and Jan, Brek. (2003). Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Dev. Cell. Dev. Biol.* 8, 982-996.

菸草微綠嵌紋病毒載體之構築與研究

姚雋儀

R97633017

(指導教授: 張雅君)

摘 要

發展植物病毒載體當作承載外源基因進入植物體內複製並短暫表現的工具已逐漸普及，由於病毒在寄主植物內能在短時間累積高複製量，因此外源基因也能同樣在接種過後的一至兩個星期在植物體內達到較高的累積量。利用病毒載體表現外源基因的方法有許多種，像是基因置換、直接將外源基因插入、抗原決定基呈現、以helper virus及subviral component的互補表現系統(helper-dependent system)、virus-dependent expression cassettes等，不同屬的病毒各利用不同表現方式，達到最有效率及最大產量。病毒載體可以穩定的表現外源基因，而不受植物某些核酸重組機制的影響，同時也因為病毒本身具有抑制基因靜默的作用，因此病毒載體能使外源基因不受靜默機制的干擾而順利表現。除此之外，病毒載體若放入綠色螢光蛋白當作報導基因便可以當作探討病毒在寄主植物內移動的有效工具。另外病毒載體也能作為研究分析特定基因功能，或是病原與寄主交互作用探討之工具，並且因為具有高產量、省時的特點，也可以當作生產疫苗的有效方法。菸草微綠嵌紋病毒 (*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV)，屬於 *Tobamovirus* 屬，具單鏈正意股RNA。TMGMV能夠感染大部分的茄科植物，且感染力強，但又不像TMV等其他的tobamovirus般造成嚴重的病徵，因此適合用來構築成為病毒載體。本實驗室在2003年從田間辣椒植株中分離出此病毒，將此分離株命名為TMGMV-HP。目前已有五個確定有感染性的cDNA選植株，從中挑出一個作為構築TMGMV病毒載體的材料，分別以幾種不同方式進行載體構築，並以綠色螢光蛋白當作報導基因，分析病毒載體的複製能力及移動情形，選出效率最佳的病毒載體，以期未來能夠在植物中表現病原菌致病相關基因，觀察植物的抗病反應，作為一個研究病原菌與植物交互作用的工具。

關鍵詞：

病毒載體、菸草微綠嵌紋病毒、短暫表現、疫苗生產、基因置換、基因插入、抗原決定基呈現

參考文獻:

1. 李青芸。2005。菸草微綠嵌紋病毒引起之辣椒新病害及其感染性選殖株之建構。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
2. Chatterji, A., Ochoa, W. F., Paine, M., Ratna, B. R., Johnson, J. E., and Lin, T. 2004. New addresses on an addressable virus nanoblock; uniquely reactive Lys residues on cowpea mosaic virus. *Chem Biol.* 1: 855-863.
3. Schlick, T. L., Ding, Z., Kovacs, E. W., and Francis, M. B. 2005. Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus. *J Am Chem Soc.* 127: 3718-3723.
4. Dohi, K., Nishikiori, M., Tamai, A., Ishikawa, M., Meshi, T., and Mori, M. 2006. Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. *Arch Virol.* 151: 1075-1084.
5. Shivprasad, S., Pogue, G. P., Lewandowski, D. J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L. K., and Dawson, W. O. 1999. Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology* 255: 312-323.
6. Man, M., and Epel, B. L. 2004. Characterization of regulatory elements within the coat protein (CP) coding region of Tobacco mosaic virus affecting subgenomic transcription and green fluorescent protein expression from the CP subgenomic RNA promoter. *J Gen Virol.* 85: 1727-38.
7. Lindbo, J. A. 2007. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol.* 145: 1232-40.
8. Scholthof, H. B., Scholthof, K. B., and Jackson, A. O. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu Rev Phytopathol.* 34: 299-323.
9. Gleba, Y., Klimyuk, V., and Marillonnet, S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol.* 18: 134-41.
10. Werner, S., Marillonnet, S., Hause, G., Klimyuk, V., and Gleba, Y. 2006. Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 17678-17683.

Detection and characterization of methylation in *Banana bunchy top virus*

張馨元

R97633002

(指導教授：葉信宏)

摘要

植物體中常見以共價性修飾 DNA 作為調控 DNA 活性的方式，其中 cytosine methylation 尤為重要。在植物體中，序列中的任一 cytosine 均可能發生 methylation，依發生的序列可分為 CG、CHG 及 CHH 三種，用以調控基因表現及維持基因體的穩定。近年來許多研究指出在植物體中不止其本身的基因體，外來的 DNA 及病毒也會發生 methylation，而 methylation 比例較高的病毒造成的病徵較輕微。另有研究發現病毒序列經 *in vitro* methylation 後其複製及轉譯受阻。總和以上，許多證據顯示寄主植物利用 cytosine methylation 作為防禦病毒感染的方式之一。香蕉萎縮病為台灣重要的香蕉病害，其病原為香蕉萎縮病毒 *Banana bunchy top virus* (BBTV)。BBTV 為 ssDNA 病毒，*Babuvirus* 屬的一員。目前關於 BBTV 和寄主植物間交互作用的瞭解有限，且仍未有 BBTV methylation 之相關研究。故本研究欲瞭解 BBTV 基因體中是否發生 methylation，因此將利用 bisulfite sequencing 及 methylation-sensitive PCR 的方式分析病毒序列 methylation 發生的情形，並藉由比較病徵強度不同的 BBTV strain 其 methylation 的情形以瞭解 methylation 和病徵的關聯性，期望對 BBTV 和寄主防禦之間有更多的認識。

關鍵詞:

methylation, *Banana bunchy top virus*

參考文獻：

1. Brough, C.L., Gardiner, W.E., Inamdar, N.M., Zhang, X.Y., Ehrlich, M. and Bisaro, D.M. 1992. DNA methylation inhibits propagation of tomato golden mosaic virus DNA in transfected protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 18:703-12.
2. Chan, S.W., Henderson, I.R., Jacobsen, S. E. 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* 6:351-60.
3. Ermak, G. , Paszkowski, U., Wohlmut, M., Scheid, O. M. and Paszkowski, J. 1993. Cytosine methylation inhibits replication of African cassava mosaic virus by two distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 21: 3445-3450.
4. Finnegan, E. J., Genger, R. K., Peacock, W. J. and Dennis, E. S. 1998. DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:223–47.
5. Raja, P., Sanville, B. C., Buchmann, R. C. and Bisaro, D. M. 2008. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J. Virol.* 82:8997-9007.
6. Tang, W. and Leisner, S. 1998. Methylation of nonintegrated multiple copy DNA in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:403-6.
7. Vaillant, I. and Paszkowski, J. 2007. Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:528–533.
8. Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Stinger, H. L. 1994. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567-576.

發展偵測香蕉條紋病毒六個品系之快速檢測方法與臺灣香蕉條紋病之調查

黃偲佳

R97633019

(指導教授：葉信宏)

摘要

香蕉條紋病毒 (*Banana streak virus*, BSV) 為 *Caulimoviridae* 科 *Badnavirus* 屬的 DNA 病毒。長久以來香蕉條紋病毒已將其基因體嵌入到拔蕉 (*Musa balbisiana*) 的基因體中，因此經過雜交育種後會使得香蕉條紋病毒的序列潛伏於雜交後代內，這些潛伏的病毒序列稱之為內源寄生性反轉錄病毒序列 (Endogenous pararetrovirus, EPRV)，此類嵌入型 (integrated form) 病毒並不會產生病徵，但是某些品系的內源香蕉條紋病毒序列卻會在適當的環境中活化成游離型態 (episomal form)，而造成嚴重的病害。香蕉條紋病毒所造成的病徵主要是在寄主葉片上形成黃化和壞疽的條紋，嚴重時會造成假莖的腐爛塌壞，更甚者將導致寄主死亡。在過去十幾年香蕉條紋病逐漸對香蕉產業造成嚴重威脅，故建立區分嵌入型和游離型香蕉條紋病毒的快速檢測方法為目前急欲發展的目標之一。先前的偵測方法包括酵素結合免疫吸附分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫捕捉聚合酶連鎖反應 (immunocapture polymerase chain reaction, IC-PCR) 和多對引子免疫捕捉聚合酶連鎖反應 (multiplex IC-PCR, M-IC-PCR) 等方法，但上述方法僅針對單一種品系的香蕉條紋病毒進行偵測，且內源寄生性反轉錄病毒序列亦會干擾 PCR 偵測游離型病毒的結果。由前人研究得知植物會將外來的基因片段進行甲基化，以抑制外來基因進行轉錄，因此在嵌入型病毒其 RNA 可能不會被轉錄表現的假設下，本實驗將針對香蕉條紋病毒六個品系的序列相似區域 (common region) 設計出適當的引子對進行反轉錄聚合酶連鎖反應實驗 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)，期望能開發出可同時偵測六個品系香蕉條紋病毒之檢測方法，並可剔除內源寄生性反轉錄病毒序列所造成的偽陽性 (false positive) 結果。方法建立後，再以此法對屏東香蕉研究所保存之兩百多個香蕉種原進行檢測，調查臺灣種原香蕉條紋病之分佈情形，以期在香蕉種原雜交育種上，幫助篩檢香蕉條紋病毒，生產無毒種苗。

關鍵詞:

Banana streak virus, Endogenous pararetrovirus, integrated form, episomal form, RT-PCR

參考文獻:

1. 呂依儒。2006。香蕉條紋病調查與細胞病理學觀察及感染系統之建立。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
2. Geering, A. D.W., Pooggin, M. M., Olszewski, N. E., Lockhart, B. E. L., and Thomas, J. E. 2005. Characterisation of *Banana streak Mysore virus* and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated *Musa*. *Archives of Virology* 150: 787–796.
3. Gayral, P., Juan-Carlos Noa-Carranza, Lescot, M., Lheureux F., Lockhart, B. E. L., Matsumoto, T., Piffanelli P., and Marie-Line Iskra-Caruana. 2008. A single *Banana streak virus* integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. *Journal of Virology* 82: 6697–6710.
4. Harper, G., Dahal, G., Thottappilly, G., and Hull, R. 1999. Detection of episomal *banana streak badnavirus* by IC-PCR. *Journal of Virological Methods* 79: 1–8.
5. Harper, G., Hart, D., Moul, S., and Hull, R. 2002. Detection of *Banana streak virus* in field samples of bananas from Uganda. *Annals of Applied Biology* 141: 247–257.
6. Harper, G., Hull, R., Lockhart, B., and Olszewski, N. 2002. Viral sequences integrated into plant genomes. *Annual Review of Phytopathology* 40:119–136.
7. Harper, G., Osuji, J. O., Heslop-Harrison, J. S. (Pat), and Hull, R. 1999. Integration of *Banana streak badnavirus* into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255: 207–213.
8. Kunii, M., Kanda, M., Nagano, H., Uyeda, I., Kishima, Y., and Sano, Y. 2004. Reconstruction of putative DNA virus from endogenous *rice tungro bacilliform virus*-like sequences in the rice genome: implications for integration and evolution. *BMC Genomics* 5:80.
9. Ndwora, T., Dahal, G., LaFleur D., Harper G., Hull R., Olszewski N. E., and Lockhart, B. 1999. Evidence that Badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255: 214–220.
10. Provost, G. L., Marie-Line Iskra-Caruana, Acina, I., and Teycheney, P. Y. 2006. Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. *Journal of Virological Methods* 137: 7–13.

煙草嵌紋病毒對寄主阿拉伯芥基因 *pap85* 調控機制之 探討

吳昭蓉

R97633004

(指導教授：葉信宏)

摘要

病毒本身基因體極小，因此必須倚靠寄主系統完成其複製及增殖的過程；然而對於病毒透過何種方式調探寄主基因，目前所知仍然有限。先前實驗室研究中為探究這些寄主基因，分別利用兩株菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 突變株進行實驗；其中一株在鞘蛋白 (coat protein, CP) 及移動蛋白 (movement protein, MP) 發生移碼突變無法產生正常蛋白，另一株則在 RNA 複製酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 上發生突變無法產生複製相關蛋白。分別利用兩株病毒感染阿拉伯芥原生質體後，抽取原生質體 RNA 進行 microarray，篩選病毒複製時受影響的寄主基因。其中寄主基因 *pap85*，在感染後 0.5-24 小時表現量皆上升。而 *pap85* 無論在轉基因植物或在原生質體進行 knock-down 實驗，病毒累積量皆降低，可知 *pap85* 影響病毒累積。本研究的目的，在於探討 TMV 調控 *pap85* 表現的機制，首先由阿拉伯芥基因體資料庫中找出 *pap85* 上游約 2000 bps 左右片段作為 promoter 候選區域，設計引子對，將不同長度的 promoter 接入具 firefly luciferase 的載體中，並對阿拉伯芥原生質體進行轉染，比較病毒感染時冷光表現量的差異，進而找出此序列上因應病毒調控的序列。逐步縮小序列範圍後，以點突變方式找出 promoter 序列上的 cis-element。根據此 cis-element 與植物 PLACE database 進行比對，找出候選因子並針對候選設計引子對，對 TMV 感染後的植物核酸進行 real-time quantitative RT-PCR，看這些轉錄因子在細胞中表現是否改變；另一方面以農桿菌在阿拉伯芥植株中對轉錄因子進行基因靜默，接種病毒後測量 *pap85* 表現量，藉此確認調控 *pap85* 的轉錄因子。

關鍵詞：

pap85, TMV, promoter assay, arabidopsis host factor.

參考文獻：

1. Figueira, A. R., Golem, S., Goregaoker, S. P., and Culver, J. N. 2002. A nuclear localization signal and a membrane association domain contribute to the cellular localization of the tobacco mosaic virus 126-kDa replicase protein. *Virology* 301: 81–89.
2. Interaction of Tobamovirus Movement Proteins with the Plant Cytoskeleton. 1995. Heinlein, M., Epel, B., Padgett, L., Hal, S., Beachy, R. N. *Science* 22: 1983-1985
3. Sutter, V. D., Vanderhaeghen, R., Tilleman, S., Lammertyn, F., Vanhoutte I., Karimi, M., Inze, D., Goossens, A. & Hilson, P. 2005. Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells. *The Plant Journal* 44: 1065–1076
4. Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S., and Ishikawa, M. 2000. TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *PNAS*. 18: 10107–10112
5. Yoo, S. D., Cho, Y. H. & Sheen, J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* 7: 1565-1572.

木瓜輪點病毒木瓜型感染性選殖株之構築及 病徵決定因子之分析

楊瑞春

R97633005

(指導教授：洪挺軒)

摘要

木瓜輪點病毒係木瓜經濟栽培業的限制因子，嚴重影響世界各地的木瓜產業。此病由馬鈴薯Y病毒屬 (*Potyvirus*) 的木瓜輪點病毒 (*Papaya ringspot virus*, PRSV) 所引起。分布於台灣地區內之PRSV，依據在木瓜葉片上所引起的病徵不同，可分成嚴重嵌紋系統 (severe mottling, SM strain)、畸形系統 (deformation, DF strain) 以及嚴重嵌紋壞疽系統 (severe mottling with necrosis, SMN strain)。為了瞭解此三系統病徵差異與核酸序列之關聯，擬以實驗室保存之純系病毒株，將SM、SMN系統構築出PRSV的全長cDNA感染性選殖株(infectious clones)，加上原先實驗室已構築之DF系統選殖株，分別再以胞外轉錄(*in vitro* transcription)方式合成純系、完整的病毒基因體RNA，接種至木瓜寄主觀察其發病病徵。目前已經先將全長10326個核苷酸的PRSV-SMN基因體分成3個大小不同、頭尾重疊 (overlapping) 的區域，進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)，增幅的cDNA片段分別進行聚合酶鏈鎖反應(PCR)增幅，配合pGEM®-T質體做選殖，獲得選殖株。隨後將以限制酶剪接各片段並接合以獲取5'端帶有T3 promoter的全長質體株。未來將繼續構築純系PRSV-SM系統，並配合前人已構築完成之PRSV-DF系統感染性選殖株，進行病毒基因體重組試驗，藉此分析PRSV各系統之病徵決定因子，以瞭解PRSV與木瓜寄主間於分子層次之互動關係對木瓜輪點病之病徵發展影響。

關鍵詞:

木瓜輪點病毒(Papaya ringspot virus)、感染性選殖株(infectious clones)、基因體重組(genomic recombination)、病徵決定因子(symptom-determinant factors)

參考文獻:

1. 李宜霞. 2006. 木瓜輪點病毒之Real-Time RT-PCR定量偵測技術之研發與應用. 國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文. pp. 110.
2. 陳冠君. 2001. 木瓜輪點病毒西瓜型生體外具感染力載體之構築及感染木瓜寄主專一性之分析. 國立中興大學植物病理學系. pp. 56.
3. 廖奕晴. 2004. 台灣木瓜輪點病毒系統之變異與鑑別及快速檢測. 國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文. pp. 54.
4. 劉亭君. 2007. 木瓜輪點病毒的感染性選植株之構築及系統間的不同基因體比較. 國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文. pp. 66.
5. Gagarinova, A. G., Babu, M., Strömvik, M.V. and Wang, A. 2008. Recombination analysis of Soybean mosaic virus sequences reveals evidence of RNA recombination between distinct pathotypes. *Virology* 5: 143.
6. Hu, X., Meacham, T., Ewing L., Gray S. M. and Karasev A. V. 2009. A novel recombinant strain of Potato virus Y suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. *Virus Res.* 143: 68–76.
7. Kelloniemi, J., Mäkinen, K. and Valkonen, J. P. T. 2008. Three heterologous proteins simultaneously expressed from a chimeric potyvirus: Infectivity, stability and the correlation of genome and virion lengths. *Virus Res.* 135: 282–291.
8. Mangrauthia, S. K., Parameswari, B., Jain, R. K. and Praveen, S. 2008. Role of genetic recombination in the molecular architecture of *Papaya ringspot virus*. *Biochem Genet.* 46: 835–846.
9. Puurand, Ü., Valkonen, J. P.T., Mäkiene, K., Rabenstein, F. and Saaram, M., 1996. Infectious in vitro transcripts from cloned cDNA of the potato A potyvirus. *Virus Res.* 40: 135-140.
10. TRIPATHI, S., SUZUKI, J. Y., FERREIRA, S. A. and GONSALVES, D. 2008. *Papaya ringspot virus-P*: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Mol Plant Pathol.* 9: 269–280.

Characterizing the involvement and mechanism of the small RNA fragments of CEVd in pathogenesis

林之昫

R97633013

(指導教授：沈湯龍)

摘要

類病毒(Viroids)是已知最小的植物病原，其基因體為僅具 246-401 個核苷酸的單股環狀 non-coding RNA。即使本身無法產生蛋白質，也不需助病毒(helper virus)輔助，類病毒仍然能在植物體內移動、複製並產生病徵；推判是類病毒 RNA 的二級結構和寄主因子直接或間接交互作用而產生的結果。最近研究發現在類病毒感染的植物體內會產生該類病毒同樣序列的 18~24 個核苷酸小片段 RNA。然而，這些小片段 RNA 與類病毒病原性的關係尚不清楚。故本研究探討類病毒小片段 RNA 與其致病機制之關聯性進行研究。首先，我們藉由 *in vitro* transcription 產生具感染性的柑橘鱗砧類病毒(*Citrus Exocortis Viroid*, CEVd) RNA 感染蕃茄感病品系 Rutgers 建立類病毒指示植物系統，並以 one-step RT-PCR、two-step RT-PCR 與 real-time PCR 進行偵測。此外發現以同樣的 CEVd 感染蕃茄品系 Rutgers 與雙福卻產生不同程度的 CEVd 病徵。我們假設病徵差異可能起因於 CEVd 複製量且或其小片段 RNA 量或序列上的差異。因此我們將利用 real-time PCR 以及 northern blot 分析比較，探討蕃茄品系間的病徵差異起因，進而了解 CEVd 致病因子。此研究將會增進類病毒分子致病機制的了解。

参考文献:

1. Carbonell A, Martínez de Alba AE, Flores R, Gago S (2008) Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* 371: 44-53
2. Ding B (2009) The Biology of Viroid-Host Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*
3. Ding B, Itaya A (2007) Viroid: A Useful Model for Studying the Basic Principles of Infection and RNA Biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 7-20
4. Flores R, Hernandez C, Martinez de Alba AE, Daros JA, Di Serio F (2005) Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 43: 117-139
5. Gã³Mez G, Martã-nez G, Pallã;S V (2009) Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends in Plant Science*: 1-6
6. Gomez G, Martinez G, Pallas V (2008) Viroid-Induced Symptoms in *Nicotiana benthamiana* Plants Are Dependent on RDR6 Activity. *Plant Physiol* 148: 414-423
7. Gómez G, Pallás V (2007) Mature monomeric forms of Hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J* 51: 1041-1049
8. Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, Qi Y, Wang Y, Takeda R, Harris AR, Molina C, Nelson RS, Ding B (2007) A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J Virol* 81: 2980-2994
9. Landry P, Perreault JP (2005) Identification of a peach latent mosaic viroid hairpin able to act as a Dicer-like substrate. *Journal of Virology* 79: 6540-6543
10. Machida S, Yamahata N, Watanuki H, Owens RA, Sano T (2007) Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *J Gen Virol* 88: 3452-3457
11. Markarian N, Li HW, Ding SW, Semancik JS (2004) RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch Virol* 149: 397-406
12. Martin R, Arenas C, Daros J, Covarrubias A, Reyes J, Chua N (2007) Characterization of small RNAs derived from *Citrus exocortis* viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* 367: 135-146
13. Stpierre P, Hassen I, Thompson D, Perreault J (2009) Characterization of the siRNAs associated with peach latent mosaic viroid infection. *Virology* 383: 178-182
14. Wang MB, Bian XY, Wu LM, Liu LX, Smith NA, Isenegger D, Wu RM, Masuta C, Vance VB, Watson JM, Rezaian A, Dennis ES, Waterhouse PM (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3275-3280

Identification and characterization of a Nep1-like protein in anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*

Chia-Chen Kan

R97633014

(Adviser: Ruey-Fen Liou)

Abstract

Nep1-like proteins (NLPs) comprise a family of secreted proteins produced by bacteria, fungi and oomycetes. NLPs have been named after the necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP1) purified from culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *erythroxyli*. With infiltration of NLPs, leaves of dicotyledons show rapid cell death and general stress responses. Monocotyledons, in contrast, are considered not to respond to the currently described NLPs. The cell death inducing mechanism of NLP was assumed to relate with pore forming ability on plasma membrane. Moreover, NLP has been shown to have effects on the virulence of some pathogens. In *Colletotrichum coccodes*, overexpression of NEP1 from *F. oxysporum* showed hypervirulence for biocontrol of weeds. NLP-deficient mutant of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* were reduced in virulence on potato tuber. However, NLPs are involved in virulence of only some pathosystems, rather than all organisms containing NLPs. *Colletotrichum gloeosporioides* cause anthracnose on a wide range of hosts. It is known to be a hemibiotroph: In the early stage of infection, the fungus acts as a biotroph, with no obvious necrosis symptom; it then turns into a necrotroph causing wide-spread cell death in the plant tissue. Although the switch between these two phases involved multiple factors, the ability of inducing active cell death in their hosts is essential for the pathogenicity. Considering this requirement, we proposed that NLP may play an important role in cell death caused by necrotrophic infection of *C. gloeosporioides*. In this study, we cloned a gene homologous to NLP that was designated as CgNLP. Expression of CgNLP in response to different carbon sources and in the infection process will be analyzed by Northern blotting. Moreover, recombinant protein of CgNLP will be obtained from *Pichia pastoris*, and its ability to cause necrosis will be assayed by infiltration into leaves of dycotyledon. Finally, a gene disruption experiment will be performed to investigate the importance of CgNLP in the infection process of *C. gloeosporioides*. These studies will uncover the importance of CgNLP in the pathogenicity of *C. Gloeosporioides*.

Keywords:

anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, necrosis, Nep1-like protein, secreted protein

Reference:

1. Amsellem, Z., Cohen B.A., and Gressel J., 2002. Engineering hypervirulence in a mycoherbicide fungus for efficient weed control. *Nat. Biotech.*, 20: 1035-1039.
2. Bailey, B., 1995. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology*, 85: 1250 - 1255.
3. Bailey, B., Apel-Birkhold P., and Luster D., 2002. Expression of NEP1 by *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* after gene replacement and overexpression using polyethylene glycol-mediated transformation. *Phytopathology*, 92: 833 - 841.
4. Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M., Nurnberger, T., 2002. NPP1, a Phytophthora-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J.*, 32: 375 - 390.
5. Ottmann, C., Luberacki, B., Kufner, I., Koch, W., Brunner, F., Weyand, M., Mattinen, L., Pirhonen, M., Anderluh, G., Seitz, H.U., Nurnberger, T., Oecking, C., 2009. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106: 10359-10364.
6. Pemberton, C., Whitehead, N.A., Sebaihia, M., Bell, K.S., Hyman, L.J., Harris, S.J., Matlin, A.J., Robson, N.D., Birch, P.R.J., Carr, J.P., Toth, I.K., Salmond, G.P.C., 2005. Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium. *Mol. Plant. Microbe Interact*, 18: 343 - 353.
7. Staats M., V.B.P., Schouten A., Van Kan J. A. L., 2007. Functional analysis of NLP genes from *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology*, 8: 209-214.

Study of the mechanism underlying phosphonate-induced plant resistance

Kuo-Hsin Wang

R97633008

(Advisor: Ruey-Fen Liou)

Abstract

The genus *Phytophthora*, which belong to Oomycetes, includes many devastating plant pathogens that can infect a wide variety of crop species. Phosphonate (PN) is known to be an effective control of many plant diseases caused by Oomycetes including *P. parasitica*. It has the advantage of being safe to the environment, and moreover, less risk for induction of chemical resistance. Previously it has been shown that PN may function by inhibiting the mycelial growth of *Phytophthora*. Not much is known, however, about the effect of PN on the activation of plant defense response. To investigate the mechanism whereby PN functions as an activator of plant defense response, a tomato (*Solanum lycopersicum*)-*P. parasitica* system for studying the effect of PN was established, and differential expression of tomato genes in response to PN treatment followed by inoculation with *P. parasitica* was analyzed by using DNA chips. The results suggested the importance of ethylene-signaling pathway in PN-induced plant resistance. To investigate the involvement of ethylene-signaling in PN-induced resistance, genes predicted to encode ethylene-responsive transcription factors and known to be up-regulated in the microarray analysis will be analyzed in the present study. Expression of these genes in response to PN treatment as well as inoculation with *P. parasitica* will be analyzed by Northern hybridization and semi-quantitative reverse transcriptase-PCR. Moreover, knockdown experiment will be performed by using tobacco rattle virus (TRV)-induced gene silencing to investigate their roles in the elicitation of PN-induced plant resistance. To study the function of genes in plant resistance, systemic expression will be performed by agro-infection, followed by challenge with *P. parasitica*. Furthermore, yeast-one-hybrid and/or gel mobility shift assay will be carried out to characterize properties of these transcription factors. It is expected that these experiment will provide solid evidence to confirm the importance of ethylene signaling in PN-induced plant resistance.

Keywords:

phosphonate, *Phytophthora*, tobacco rattle virus, potato virus X

References:

1. 林筑蘋。2009。亞磷酸誘導植物抗病機制之初探。國立台灣大學植物病理與微生物研究所碩士論文。
2. 安寶貞。2001。植物病害的非農藥防治品-亞磷酸。植物病理學會刊。10：147-164。
3. Attard, A., Gourgues, M., Galiana, E., Panabieres, F., Ponchet, M., Keller, H. 2008. Strategy of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). Journal of Plant Physiology. 165: 83-94.
4. Coffey, M. D., and Joseph, M. C. 1985. Effects of phosphorous acid and fosetyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola*. Phytopathology. 75: 1042-1046.
5. Daniel, R., and Guest, D. I. 2006. Defense responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 67: 194-201.
6. Guest, D. I., and Great, B. R. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. Biological Reviews. 66: 159-187.
7. Kendrick, M. D., and Chang, C. 2008. Current Opinion in Plant Biology 11: 479-485.
8. Luttringer, M., and de Cormis, L. 1985. Absorption, dégradation et transport du phoséthyl-Al et de son métabolite chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Agronomic. 5: 423-430.

An assessment on the potential of using fungi as a biocontrol against *Aulacaspis yasumatsui* Takagi

蔡昇宏

R97633011

(指導教授:曾顯雄)

摘 要

蘇鐵白輪盾介殼蟲(*Aulacaspis yasumatsui* Takagi)，於 2001 年在台灣北部被發現後，逐漸往南部傳播感染至一般庭院、校園之蘇鐵，此外甚至傳播至東部台東紅葉村之台東蘇鐵 (*Cycas tailungensis*) 自然保護區內。蘇鐵白輪盾介殼蟲是台灣外來種，對於台灣特有種台東蘇鐵危害嚴重導致大量枯萎。台東自然保護區內地形崎嶇，施用化學藥劑困難、成本高，且有污染水源之虞，因此尋求生物防治似為較佳之策略。蟲生真菌常被開發為真菌性殺蟲劑，施用於田間對環境影響小也可有效控制害蟲族群數量，但缺點是無法收到立竿見影之效，而且防治成效也會受到環境影響，以上皆有賴劑型或遺傳性狀之改良。嘗試進行相關之生物防治，自田間採集受白輪盾介殼蟲嚴重感染之蘇鐵葉片，剪枝後以濕室培養數日後分離蟲體上可能之蟲生真菌，以型態鑑定，並萃取核酸，以廣泛性引子對其用聚合酶連鎖反應增幅 ITS1-5.8s-ITS2 rDNA 並進行定序後，於 NCBI 資料庫進行線上比對可能物種作為輔助，確認菌種。除此之外，亦針對和白輪盾介殼蟲同為同翅目之粉蝨，進行採集以及分離可能之蟲生真菌。其後，設計不同劑型之孢子懸浮液以及利用噴灑、塗抹、浸漬、爬行等方法進行接種，預期重現其病原性，完成柯霍氏法則，最後以致死率、蟲體平均生存時間長度和其耐熱性評估生物防治潛能。

基轉作物黑色素生合成基因以提昇其逆境抗性

Engineering melanin in crops to enhance antistress capacity

林斌

R633009

(指導教授:曾顯雄)

摘要

於田間種植作物常遇到高溫、乾燥、高輻射等逆境，以亦受病蟲害侵襲，導致產量降低。黑色素(melanin)廣泛存在各種生物體內，具有保護減低生物受到UV傷害、抗氧化、清除自由基等功能、並能提高微生物對高溫、乾燥之耐性。故嘗試應用基因重組技術，將真菌之黑色素生合成基因轉殖至植物，再探討其耐逆境及抗病之能力。首先，將磚格孢菌(*Alternaria alternata*)之黑色素生合成基因 polyketide synthase (PKS)、scytalone dehydratase(SCD)、1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase(THR)，與木黴菌(*Trichoderma reesei*)之黑色素生合成基因 tyrosinase(TYR)，構築於 binary vector 轉型載體 pCAMBIA 1305.2 中。載體 pCAM-PKS 以 hygromycin resistant gene (hygromycin phosphotransferase gene ; *hph*) 為 selection marker，內建有 PKS 之 full length gDNA；載體 pCAM-bar-SCD-THR 以 glufosinate-ammonium resistant gene (bialaphos resistant gene ; *bar*) 為 selection marker，內建有 SCD 與 THR 之 full length cDNA；載體 pCAM-DsRed-TYR 以 DsRed 為 reporter gene，內建有 TYR 之 full length cDNA，將上述載體以電穿孔 (electroporation) 送入農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105)。應用農桿菌之轉型系統 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation ; ATMT)，將基因轉入菸草 (*Nicotiana tabacum* cv. W38) 使其表現基因並產生黑色素，首先以聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 與南方氏雜合 (southern blot)，確定其遺傳特性，更進而測試其對 UV、乾旱、高溫的耐受性及其對各類病原之抗病性。若黑色素生合成基因可以成功表現於菸草，則下一步則是以番茄與水稻等糧食作物為目標，以期解決逆境所衍生之諸多問題。

關鍵詞:

melanin, antistress, polyketide synthase, scytalone dehydratase, 3,8-trihydroxynaphthalene reductase, tyrosinase , *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

參考文獻:

1. 鐘珮哲. 2005. 轉殖蟲生真菌黑色素生合成基因以增加其逆境之抗性. 國立台灣大學植物病理與微生物所碩士論文.
2. 王淞民. 2009. 基轉超寄生菌 *Trichoderma* spp. 黑色素生合成基因以提昇其逆境抗性與致病力. 國立台灣大學植物病理與微生物所碩士論文.
3. Bell, A. A., and Wheeler, M. H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopath.* 24:411-451.
4. Butler, M. J., and Day, A. W. 1998. Fungal melanin: a review. *Can. J. Microbiol.* 44:1115-1136.
5. Kawamura, C., Tsujimoto, T., and Tsuge, T. 1999. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 12:59-63.
6. Kimura, N., and Tsuge, T. 1993. Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *J. Bacteriol.* 175:4427-4435.
7. McCullen, C. A., and Binns A. N. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:101-127.
8. Sallaud, C., Meynard, D., van Boxtel, J., Gay, C., Bès, M., Brizard, J. P., Larmande, P., Ortega, D., Raynal, M., Portefaix, M., Ouwerkerk, P. B. F., Rueb, S., Delseny, M., and Guiderdoni, E. 2003. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor. Appl. Genet.* 106:1396-1408.
9. Vitaly, C., Stanislav, V., Lacroix, B., Adi, Z., Mery, D. Y., Shachi, V., Andriy, T., and Tzvi, T. 2007. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cellul. Microbiol.* 9:9-20.
10. Yalpani, N., Altier, D. J., Barbour, E., Cigan, A. L., and Scelonge, C. J. 2001. Production of 6-methylsalicylic acid by expression of a fungal polyketide synthase activates disease resistance in tobacco. *Plant Cell.* 13: 1401–1410