「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 57-64 (1996)

木瓜輪點病毒鞘蛋白轉基因木瓜之抗病性

鄭櫻慧 葉錫東

中興大學植物病理學研究所

摘要：為了利用植物遺傳工程方式將木瓜輪點病毒(PRV)鞘蛋白(coat protein，CP)基因轉移至木瓜以產生抗病性狀，木瓜轉型作用之進行係以金剛砂製造傷口，經由*Agrobacterium tumefaciens*媒介，將GUS或PRV 5'前導序列表現的PRV鞘蛋白基因導入木瓜幼胚分化組織中，並再生成轉基因植株。經由PCR及西方漬染法分析，確定CP基因存在轉型木瓜株系中，並可表現產生PRV的鞘蛋白，計獲得包含GUS前導序列的10個株系及PRV 5'前導序列的3個株系。先以組培養技術繁殖其R_0植株，經由發根、馴化，使其在溫室生長兩個月後，進行挑戰接種，以測定其抗病性狀。實驗中以來自臺灣、夏威夷及泰國三個不同來源的PRV YK、HA及TH系統供試。接種後在溫室中觀察其結果，不表現病徵之植株再以酵素連結免疫呈色法(ELISA)及生物分析偵測是否有病毒增殖。抗病篩選得到四個抗同源PRV YK的株系：GCP 16-0、GCP 17-0、GCP 17- 1及GCP 17-3，在此四株系中，GCP 17-1及GCP 17-3對異源的PRV HA及TH系統仍有高度抗性，GCP 16-0則對異源病毒只有中度抗性，而GCP 17-0的抗病能力為系統專一性的抗病現象，只對同源病毒系統有抗病力。目前此四抗病毒株系仍繼續於隔離溫室中培養，其生長情形與一般木瓜一致。但此四株系均為雌株，以日昇之花粉授粉，果實生長情形與外觀形狀也都正常。目前GCP 17-1之R_1種子已發芽，並於溫室中栽培，再次進行抗病檢定中。由於GCP 17-1及GCP 17-3對不同來源的三個病毒系統都有極高的抗病力，其未來可望不受地區限制而能廣泛應用以防治木瓜輪點病毒。

關鍵詞：木瓜輪點病毒、鞘蛋白、木瓜。

前　言

木瓜(*Carica papaya* L.)是熱帶及亞熱帶廣為栽培的重要果樹。它是多年生半木本的雙子葉植物，生活史比一般熱帶果樹短，種植後8-10個月即可採收果實。木瓜不但是廣受喜愛的水果，也是生產木瓜酵素(papain)及其它醫藥生化成份的原料，頗具經濟價值。

木瓜在生長期間最嚴重的病害為遭受木瓜輪點病毒(papaya ringspot virus，簡稱PRV)感染。PRV自1945年在夏威夷之歐胡(Oahu)島被發現以來[10]幾乎已使世界上所有的木瓜產地均受危害。台灣自1975年最先在高雄縣的燕巢、阿蓮、大樹等地發現輪點病毒，之後在短短二、三年內摧毀全省各地大部份木瓜園。罹病木瓜在葉片上產生嵌紋及扭曲變形，在莖及葉柄產生水浸狀條斑，並在果實上引起輪點狀圓斑等病徵。罹病株的果實大減，品質變差並帶有苦味，失去經濟價值。木瓜輪點病毒屬於馬鈴薯Y群病毒(potyvirus group)，為長絲狀顆粒，大小約780×12 nm。可經由機械接種或蚜蟲傳播[20]。

防治病毒病害最有效的方法爲抗病育種。在沒有抗病基因可利用的情況下，較可行的方法是交互保護(cross protection)，交互保護作用之現象於 1929 年由 Mckinney 氏發現，即植物受一病毒感染後，對同類型病毒感染具有抗病能力，利用此一現象，可讓植物感染一種對其本身沒有影響或影響不大的輕症系統病毒，此植物即受到保護而抗同類型强病系統病毒的感染。近年來由於遺傳工程的進步，根據植物病毒交互保護的理論，藉由基因轉殖的技術，將病毒的一部份轉移至寄主植物染色體內，可達到抗病毒感染的目的。Powell-Abel[19] 先將 TMV 之鞘蛋白(coat protein, CP)基因轉移至煙草，轉基因煙草表現出抗病毒感染之能力，達到延遲發病的效果，此現象被稱之爲鞘蛋白媒介的抗性(coat protein-mediated resistance)。近年來，鞘蛋白轉基因植物在許多病毒群中皆有報告[7]。鞘蛋白媒介的抗性除了對同源性 (homologous) 病毒外，對異源 (heterologous) 病毒系統或類源相近之病毒亦有抗性，此現象稱之爲廣效的鞘蛋白媒介抗性。這些經由遺傳工程方式導入病毒基因，使轉基因植物具有抗病毒感染的能力，且有不改變作物的園藝性狀，也不增加生產成本的優點，實爲防治病毒病害的嶄新途徑。

木瓜轉基因作用之研究現況

用來作爲轉移外來基因的方法，最常見的爲農桿菌媒介的轉型作用，但因農桿菌有其寄主範圍限於雙子葉植物的缺點，因此另外發展出電孔法 (electroporation)[8]， DNA 直接吸附法[12]，此二方法可應用於原生質體之基因轉移，並且不受寄主範圍限制。而以花粉管爲DNA導入之通道[15]，注射DNA至柱頭[2] 及近年來廣爲利用的粒子槍媒介轉型作用[11]，可不受寄主範圍限制之外，也改進了原生質體不能誘導再生的關卡。粒子槍媒介之轉型作用雖有許多優點，但仍有費用昂貴且其基因轉移併入染色體而可遺傳至子代之效率偏低等缺點。 Bidney[1] 以粒子槍製造傷口，再以農桿菌感染來轉移外來基因，結果可大幅提高轉型作用之效率。

木瓜的許多組織都曾用來做爲組織培養的材料，並且再生成植株，但是除了未成熟胚之外，其它組織的效率都很低。在木瓜的轉型實驗方面，1988 年Pang 及 Sanford[18] 曾利用帶有腫瘤基因的Ti載體導入外來基因至木瓜的癒合組織，腫瘤細胞持續串生但無法再生成植株。Fitch 等人利用粒子槍媒介將 PRV HA 5-1 系統的鞘蛋白基因導入木瓜[4]，鞘蛋白基因可遺傳至子代，並篩選到一抗PRV HA系統感染之株系[6]，但爲系統專一性的抗性，只抗夏威夷HA系統而不抗其它地區分離得來的病毒系統。 Fitch 等人並於1993[5]報告利用傳統的Ti質體媒介轉移此鞘蛋白基因至植物，但耗時甚久，且經長時間的 2,4-D 處理，易導至變異而無法再生成正常植株。Yang 等人[25] 亦曾利用傳統的Ti質體媒介 GUS 基因轉移至葉柄培植體，並誘導轉型癒合組織，但效率不高且轉基因植株易生變異。綜觀前人的研究，組織培養誘導再生爲轉型木瓜之最大障礙，而誘導自未成熟胚，具有高分化能力的擬胚化組織實爲通過此一障礙的捷徑。本研究之目的即在以遺傳工程方法將 PRV 的鞘蛋白基因轉移至木瓜，以獲得抗 PRV 的轉基因木瓜，來做爲有效防治輪點病的新策略。

本省 PRV CP 基因之構築

質體 pBI 121 含有*npt* II 基因及 *gus*基因(clontech)，pTMD 9 則含有PRV台灣强病嵌紋系統(YK

系統) 的NIb、CP基因及 3' 端非轉譯區[22]。此二質體分別在 *gus* 基因及 CP 基因前利用定點突變產生 *Nco*I 切位，並利用 *Nco*I / *Sac*I 兩切位將 CP 基因轉殖至 pBI 121，取代 *gus* 基因，使 CP 基因因獲得前導序列 (leader sequence) 及轉譯起始碼 (initiation codon) 而可轉譯出蛋白，此一構築之質體稱爲 pGCP。另一構築 p5'CP 係以PRV HA 之 5' 區域 (nt 1-347)，含有病毒的前導序列及 P1 蛋白的 97 個氨基酸[24]，置於 CP 基因之前而組成。

pGCP 及 p5'CP 分別利用三親本交配 (triparental mating) 轉移到 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 [21]。*A. tumefaciens* 於含有 kanamycin (50 mg.l^{-1}) 及 streptomycin (100mg. l^{-1}) 之LB，培養於 28℃，36 小時，可做爲植物轉型之用。

植物轉型作用及再生

木瓜 (*Carica papaya* var. Tainung No.2) 授粉後75-90天之未成熟胚培養於含有2,4-D(2 mg .l^{-1}) 的誘導培養基[4]，培養3-4星期後之擬胚化組織即可做爲轉型作用之材料。

進行轉型作用時，先於含有金鋼砂之水中振盪產生細微傷口後，再以 *Agrobacterium* 媒介，將 *npt* II 及 CP 基因轉入木瓜細胞，再利用組織培養技術誘導再生，並經由選擇性培養基篩選，可得到轉型成功之體胚。不經轉型作用之擬胚化組織在選擇性培養基上無法生長而逐漸褐變。

培養於選擇性培養基上二至三個月後，327 個擬胚化組織再生出 52 叢體胚 (每一叢生體胚由一擬胚化組織而來)，轉型作用的效率由 0 至 72.4 %，平均爲 15.9 %。

每一單獨體胚在含有 NAA、BA 及kanamycin 的選擇性培養基培養二至四星期後會長出叢生芽體。非轉型體胚則無法發芽而白化死亡。由單一體胚而得的叢生芽體視爲一植物株系。1.0-1.5 cm 高的芽体可自叢生芽體中切下，移至 IBA 培養基做發根處理。

在含有 MS 培養液的蛭石中發根生長的轉基因木瓜植株外觀正常。經馴化後，即可移到空調溫室 (23-28℃) 培養，做進一步觀察。

轉基因木瓜之確認

木瓜染色體 DNA 的抽取依 Mettler[16] 的方法進行。每一 PCR 模板用量爲 1 mg 經 RNase A 處理之 DNA，上游引子 (primer) M0928，$^{5'}$ATTCCGGTCTGAATGAGAAGC$^{3'}$，下游引子 MO 1008，$^{5'}$GTGCATGTCTCTGTTGACAT$^{3'}$，分別對應 PRV YK 之核酸序列 9277-9296 及 10077-10096[22]。PCR 設定時間爲 94℃ 1 min，55℃ 2 min 及 72℃ 3 min，30 個循環。PCR 產物以 1% agrose 電泳分析。利用對應 CP 基因的二引子，經由 PCR 技術，可自轉基因木瓜株系 GCP 16-0，GCP 16-1，GCP 17-0，GCP 17-6 及 GCP 18-1的染色體 DNA 中放大出預期的 0.82 kb DNA 片段，但在非轉基因木瓜的染色體中，則無法放大出此一片段。

西方漬染分析利用 PRV 的抗血清偵測木瓜體內蛋白產生的情形，木瓜的葉片或癒合組織研磨於蛋白裂解緩衝液 (62.5 mM Tris-HCl, pH 7.2, 10mM EDTA, 2% SDS, 3% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol 及0.005% bromophenol blue) 中。萃取液以95 ℃ 加熱 5 min，並以低速離心去除植物殘渣萃取之蛋白以 SDS-PAGE [13] 分析後，轉移至 PVDF 濾膜 (Millipore Co.)。免疫漬染步驟依 *gus* Gene Fusion System (Clontech) 的方法進行。在轉基因木瓜株系中，GCP 16-0，GCP 16-1，GCP

17-0，GCP 17-6 及 GCP 18-1 均可偵測到與 PRV 抗血清反應之 36 kDa 蛋白。但此一蛋白則無法在非轉基因木瓜內測到。

同源的台灣病毒系統 (YK 系統) 的抗病測試

挑戰接種試驗中使用了三個不同來源的病毒系統：YK 系統從臺灣永康地區分離而得[22]。供試轉基因木瓜株系均由組織培養技術繁殖。並於空調溫室中 (23-28℃) 培養兩個月。接種原爲感染 PRV 之木瓜幼嫩葉片，以 1：20 比例研磨於冰的 0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.0)，以機械接種於木瓜之第三、四片開展葉片，每一葉片接種 200 μl 之感病葉片汁液。接種後之植株置於溫室中，觀察病徵發展。

轉基因木瓜 R_0 植株經由組織培養繁殖而來，發根後的植株在溫室中培養二個月後供作接種測試之用。接種後病毒在植物體內複製的情形以 ELISA 或生物分析測定。轉基因木瓜本身會因表現 CP 基因而產生鞘蛋白，但相較於病毒複製所累積的鞘蛋白，其產量太少而不足以干擾 ELISA 結果。在供試的株系中GCP 16-0，GCP 16-1，GCP 17-0，GCP 17-1，GCP 17-2，GCP 17-3，GCP 17-5，GCP 17-6， GCP 18-0 及 GCP 18-1 爲含有 *gus* 前導序列的構築，5'CP 18-1，5'CP 18-2 及 5'CP 18-4 則含有病毒本身的前導序列。接種 YK 系統十天後，非轉基因木瓜植株之葉片上產生嵌紋病徵，且其莖部出現典型的水浸狀條斑；轉基因株系中，GCP 17-2，GCP 17-5，GCP 17-6，GCP 18-0，GCP 18-1，5'CP 18-1，5'CP 18-2 及 5'CP 18-4 既沒有延遲病徵出現，也沒有減緩病徵嚴重程度。轉基因株系 GCP 16-1 則可延緩病徵表現 4-12 天。GCP 17-0 接種植株中，80% 植株延遲 4-14 天出現病徵，且病徵輕微，植株高度亦與健康植株一般；其餘 20 % 之植株不表現病徵，也偵測不到有病毒感染的跡象。GCP 16-0 的接種植株中，只有30% 表現輕微病徵且延遲發病 2-6 天。其餘 70% 植株既不表現病徵，也測不到病毒感染。GCP 17-1 及 GCP 17-3 則表現絕佳抗性，於 YK 系統接種時，全部的植株都不受感染，亦偵測不到病毒。

對異源的夏威夷 (HA) 及泰國 (TH) 病毒系統的保護效果

Fitch 等人[6] 利用弱病系統 HA 5-1 的CP 基因構築轉基因木瓜，他們得到對同源强病 HA 系統抗性極佳的轉基因木瓜株系，但此株系也和傳統的交互保護一樣，表現系統專一性的抗病現象，而不抗異源的 TH 系統及其他地區的病毒系統[26]，在我們構築的轉基因木瓜的接種試驗中，强病系統 HA 系統分離自夏威夷[9]，TH 系統分離自泰國 。GCP 16-1，GCP 17-6，GCP 18-0，GCP 18-1 及 5'CP 18-1 等株系無法延遲病徵表現，GCP 16-0，GCP 17-1 及 GCP 17-3 三株系在 10 棵接種植物中分別有4，3及 2 棵植株延持發病 0- 10 天，其於6-8 棵植株則不受到病毒感染（如圖一）。GCP 17-0 可延遲 4-8 天發病。TH 系統的接種試驗中，GCP 17-6 及 GCP 18-0 二株系沒有延遲發病的效果，GCP16-0 及 GCP 17-0 可延緩病徵表現 0-10 天不等。GCP 17-1 及 GCP 17-3 的十棵接種植物中，各有兩棵植株發病，但其餘八棵在六十天的觀察期間都沒有發病。



圖一、轉基因木瓜株系 GCP 17-1 接種病毒 PRV HA 三星期後並不發病(圖左)，非轉基因木瓜則顯現典型嚴重病徵(圖右)。

Fig. 1. Transgenic papaya line GCP 17-1 (left) did not show any symptoms 3 weeks after inoculation with PRV HA, the untransformed papaya showed severe symptoms (right).

討　論

鞘蛋白所媒介的保護作用 (coat protein-mediated protection) 已在許多轉基因植物上被證實可抵抗病毒感染[7]。和傳統的交互保護作用比較，鞘蛋白媒介的保護作用的優點包括不必特意找尋病毒的弱病系統，不須長期保存和大量繁殖接種原，避免弱病系統回變和仍對植物生長造成少許影響的困擾。並且，種植鞘蛋白轉基因木瓜既不增加農民成本，也不增加栽培手續，完全不加重農民負擔。在馬鈴薯 Y 病毒群中，也有許多病毒的鞘蛋白基因被轉入菸草或馬鈴薯等植物而有抗病能力。Fitch 等人[6] 也將 PRV HA 5-1 系統的鞘蛋白基因，利用粒子槍轉至木瓜植株，轉基因木瓜雖抗同源的夏威夷 HA 系統病毒，但對泰國的異源系統不具保護能力。他們的報告顯示所得到轉基因木瓜與傳統的交互保護一樣，只具有系統專一性的保護能力。我們構築的 PRV YK 系統鞘蛋白轉基因木瓜各株系中，對病毒感染的抗病能力亦不相同，有些株系完全不具抗病能力，部份株系表現系統專一性保護能力，但有二株系 GCP 17-1及GCP 17-3 在三個來自不同地區的強病系統接種試驗中，其對異源的夏威夷系統 (HA) 及泰國系統 (TH) ，和對同源的臺灣 (YK) 系統都有表現完全的抗病能力，不受這些強病系統的感染。

雖然包括 HA、HA5-1及 YK 系統在內的已解讀鞘蛋白核甘酸序列的 PRV 的五個病毒系統中，其鞘蛋白的相似性超過 93 %[22]，但在 Fitch 等人[6] 及本研究中，都發現鞘蛋白轉基因木瓜有系統性保護現象。但因鞘蛋白的累積並非扮演決定抗病性的主要因子，且其現象甚爲複雜，因此，鞘蛋白媒介保護現象之機制目前仍不明瞭[7]。在本研究中，鞘蛋白轉基因木瓜的抗病能力檢測仍賴挑戰接種。經由接種篩選出的株系 GCP 17-1及GCP 17-3 因對不同地區來源的強病系統具有廣泛

的抗病能力，因此具有相當高的潛力去應用於臺灣以外的木瓜產區。

以木瓜葉柄爲材料，雖可誘導再生成體胚，但需時甚久[24]。在以葉柄材料進行*Agrobacterium*媒介轉型作用並得到轉基因木瓜耗時約 12 － 18 個月[25]。利用未成熟胚誘導擬胚化組織，並以粒子槍轉移外來基因需時 13 個月，可得到轉基因木瓜[5]。在本研究中，利用擬胚化組織爲材料，以金鋼砂製造細小傷口再以*Agrobacterium*媒介轉型作用，不但提高了轉型作用的效率，且只需時九個月，大幅縮短再生體胚所需時間，並降低了組織培養於 2,4-D 培養基所誘發的突變率。經挑戰接種獲得的四抗病毒株系仍繼續於隔離溫室中培養，其生長情形與一般木瓜一致。但此四株系均爲雌株，以日昇之花粉授粉，果實生長情形與外觀形狀也都正常。目前 GCP 17-1 之 R_1 種子已發芽，並於溫室中栽培，再次進行抗病檢定中。

在本實驗中係利用金鋼砂製造傷口，並以*Agrobacterium*媒介轉型作用，爲一簡單方便有效率的基因轉移過程，且不需粒子槍這類昂貴的儀器設備。此一轉型方法係先誘導出再生能力極强的擬胚化組織，再於其上製造細小傷口，進行轉型作用，因轉型細胞都具有極高的再生能力，可大幅縮短一般轉型細胞再生所需的時間。因此，此一轉型方法可應用於其他再生時間長的作物。

參考文獻

1. Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sim, L., and Huffman, G. 1992. Microprojectile bombardment of plant tissue increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens.* Plant. Mol. Bio. 18, 301-313.
2. de la Pena, A., Lorz, H., and Schell, J. 1987. Transgenic rye plants obtained by injection DNA into young floral tillers. Nature 325, 274-276.
3. Fitch, M. M. M., and Manshardt, R. M. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). Plant Cell Rep. 9, 320-324.
4. Fitch, M. M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J. L., and Sanford, J. C. 1990. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 9, 189-194.
5. Fitch, M. M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., and Slightom, J. L. 1993. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium* -mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Rep. 12, 245-249.
6. Fitch, M. M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J. L., and Sanford, J. C. 1992. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Bio/Technology 10, 1466-1472.
7. Fitchen, J. H., and Beachy, R. N. 1993. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. Annu. Rev. Microbiol. 47, 739-763.
8. Fromm, M. E., Taylor, L. P., and Walbot, V. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. Nature 319, 791-793.
9. Gonsalves, D., and Ishii, M. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. Phytopathology 70, 1028-1032.
10. Jensen, D. D. 1949. Papaya ringspot virus and its insect vector relationships. Phytopathology 39,

212-220.

11. Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., and Sanford, J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivery of nucleic acids into living cells. Nature 327, 70-73.
12. Kren, F. A., Mans, R. M. W., San Slogteren, T. M. S., Hoge, J. H. C., Wullems, G. J., and Schilperoort, R. A. 1985. Structure and expression of DNA transfered to tobacco via transformation of protoplasts with Ti plasmid DNA : co-transfer of T-DNA and non-T-DNA sequences. Plant Mol. Biol. 5, 223-234.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature 227, 680-685.
14. Ling, K., Namba, S., Gonsalves, C., Slightom, J. L., and Gonsalves, D. 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. Bio/Technology 9, 752-758.
15. Luo, Z., and Wu, R. 1989. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. Plant Mol . Biol . Rep. 7, 69-77.
16. Mettler, I. J., Center, W. R., and Co, S. C. 1987. A simple and rapid method for minipreparation of DNA from tissue cultured plant cells. Plant Mol. Biol. Rep. 5, 346-349.
17. Mc Kinney, H. H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Island, West Africa, and Gibraltar. J. Agric. Res. 39: 557-578.
18. Pang, S. Z., and Sanford, J. C. 1988. *Agrobacterium* -mediated gene transfer in papaya. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113, 287-291.
19. Powell Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffman, 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.
20. Purcifull, D. E., Edwardson, J. R., Hiebert, E., and Gonsalves, D. 1984. Papaya ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No.84.
21. Rogers, S. G., Horsch, R. B., and Fraley, R. T. 1986. Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti-plasmid vectors. Methods Enzymol. 118, 627-640.
22. Wang, C. H., Bau, H. J., and Yeh, S. D. 1994. Comparison of the nuclear inclusion B protein and coat protein genes of five papaya ringspot virus strains distinct in geographic origin and pathogenicity. Phytopathology 84, 1205-1210.
23. Wang, C.-H., and Yeh, S.-D. 1992. Nucleotide sequence region of severe, mild and non-papaya infecting strains of papaya ringspot virus. Arch. Virol. 127, 345-354.
24. Yang, J.-S., and Yu, C.-A. 1992. Plant regeneration from petioles of *in vitro* regenerated papaya (*Carica papaya* L.) shoots. Bot. Bull. Acad. Sin. 33, 375-381.
25. Yang, J.-S., and Yu, C.-A., Cheng, Y.-H., and Yeh, S.-D. 1995. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium* -mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. Plant Cell Rep. (in press)
26. Yeh, S.-D., and Gonsalves, D. 1994. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus

by cross protection. Adv. Dis. Vector Res. 10, 237-257.

27. Yeh, S.-D., Jan, F. -J., Chiang, C.-H., Doong, T.-J., Chen, M.-C., Chung, P.-H., and Bau, H.-J. 1992. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. J. Gen. Virol. 73:2531-2541.

Resistance Evaluation of the Transgenic Papaya Lines Expressing the Coat Protein Gene of Papaya Ringspot Virus

Ying-Huey Cheng and Shyi-Dong Yeh

Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Abstract

The coat protein (CP) of a local mosaic strain of papaya ringspot vrius (PRV YK) was previously constructed in the Ti-vector for generation of transgenic papaya resistant to PRV infection. The CP gene with a GUS or the PRV leader sequence was transferred to embryogenic tissues derived from immature embryos of papaya via *Agrobacterium* -mediated transformation assisted by carborundum-wounding treatment. The presence and the expression of the transgene in the putative transgenic lines regenerated were confirmed by PCR detection and Southern blotting. R_0 plants of ten CP-transgenic lines with the GUS leader and three lines with the virus leader were established by micropropagation. The plants were challenged with three different strains of PRV originated from Taiwan (YK), Hawaii (HA), and Thailand (TH). The infection of PRV was determined by symptom observation, ELISA and bioassay. Four lines of GCP 16-0, 17-0, 17-1, and 17-3 were found to be resistant to the homologous YK strain. Among them, GCP 17-1 and 17- 3 were highly resistant to the heterologous HA and TH strains, GCP 16-0 were moderately resistant to the heterologous strain HA and GCP 17-0 was specifically resistant only to the homologous YK strain. All four lines were female and their horticultural properties were similar to the untransformed papaya. The R_1 plants of GCP 17-1 crossed with Sunrise papaya have been obtained and their resistance to PRV infection are currently evaluated under greenhouse conditions. The broad resistance in GCP 17-1 and 17-3 indicated that they have a great potential to be applied in different areas for control of the notorious PRV.

Key words: papaya ringspot virus, coat protein, papaya.