

## 香蕉生物技術研究最新發展<sup>1</sup>

### Recent Developments in Biotechnological Research on Bananas (*Musa* spp.)

鄧澄欣<sup>2</sup> 陳福旗<sup>3</sup>譯

Translated by

Ching-Yan Tang and Fure-Chyi Chen

#### 前 言

本文所指「香蕉」包括鮮食蕉、煮食蕉、製作啤酒用的香蕉及菜蕉 (plantain)。香蕉算是世界上最重要水果作物，每年產量超過8千萬公噸<sup>(4)</sup>。在生產香蕉的120個國家中，大部分屬於第三世界，香蕉成爲當地重要食品，包括鮮食、煮食或加工製成啤酒、脆片或其他產品。香蕉除可作爲碳水化合物主要來源外，更富含鉀和維他命B和C。在熱帶地區的食物，常常缺乏的維生素A，但菜蕉卻含量豐富。把經過急凍乾燥的香蕉果肉加在膽固醇含量高的飼料中，用以餵食老鼠，有降低膽固醇的效用<sup>(36)</sup>。香蕉是四億人口的主要糧食，除了稻米、牛奶和小麥外，香蕉是發展中國家排列第四的主食來源。以總產值來算，也是名列第四，只在稻米、小麥和玉米之後。

- 
1. 譯自Sagi, L ,G.D.May, S.Remy and R. Swennen.1998. Recent developments in biotechnological research on bananas (*Musa* spp.).Biotechn. and Genet. Eng. Rev. 15:313-327.
  2. 台灣香蕉研究所研究員。Research Fellow, Taiwan Banana Research Institute, P.O.Box 18, Chiuju, Pingtung, Taiwan 904.
  3. 國立屏東科技大學農園生產系教授。Professor, Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science & Technology, Pingtung, Taiwan 91201
  4. 本文於民國八十八年十二月二十八日收到。Date received for publication: Dec. 28, 1999.

全球約一成的香蕉總產量用作出口，以之為鮮食水果的人口以百萬計。香蕉出口貿易總值三十億美元以上<sup>(3)</sup>。所以香蕉的栽培對許多發展中國家非常重要，成為外匯重要來源。香蕉生產平均分佈在全球不同地區，在拉丁美洲及加勒比海為30%、非洲34%、亞太地區29%。但栽培的香蕉種類卻有很大的差異。在拉丁美洲及加勒比海超過八成的香蕉屬鮮食蕉，而在亞太地區則以煮食蕉為主。菜蕉的主要產地在中西非及拉丁美洲，而高地品種僅限於東非種植。

## 香蕉生產的主要瓶頸

基於生物學的特性，香蕉雖是全球最重要作物之一，但在各種主要糧食作物中，其研究工作為最少。大多數香蕉栽培種屬於三倍體，具不育性，使雜交育種不易成功。加上生育期長，就算是簡單的田間試驗，也要2-3年才能完成。防治香蕉病蟲害的費用雖達生產成本的四成，但因著以上的因素，難以用傳統育種方法來解決這些問題。

最嚴重的香蕉病害可算是葉斑病。葉斑病可由真菌 *Mycosphaerella fijiensis* Morelet引起，稱為黑葉斑病(Black Sigatoka)。若由 *M. musicola* Leach ex Mulder 引起，則稱為黃葉斑病(Yellow Sigatoka)。葉斑病感染所有香蕉品種，在大部分香蕉產區非常普遍，往往造成高達30-50%的產量損失<sup>(51,78)</sup>。在蕉園噴施殺菌劑，每年每公頃花費在600-1800美元之間。除了造成環境污染外，在後園或小農耕作情況下，使用殺菌劑的經濟效益是值得懷疑。最近有關抗病育種的成就仍是有限，這些研究均需長期進行<sup>(68,89,90)</sup>。其次為香蕉巴拿馬病(或稱黃葉病)。此病由 *Fusarium oxysporum* Schlecht.f.sp. *cubense* (E.F.Smith)Snyd. and Hansen<sup>(76)</sup>所引起。這種在土壤中的真菌，曾在1960年代造成歷史上最具有毀滅性的流行病害。其第一生理小種差不多毀滅了四萬公頃的蕉園。另一個新的第四生理小種<sup>(79)</sup>現正危害著亞熱帶地區的香蕉出口產業<sup>(63)</sup>。此病原菌從支根侵入，阻塞維管束系統，使植株呈典型枯萎病徵。因為缺乏有效的殺菌劑，香蕉生產只能在沒有感染病害的蕉園中種植。

最嚴重的香蕉病毒病害為萎縮病，是由一種單股DNA型的萎縮病毒(BBTV)所引起，屬於新類型的植物病毒<sup>(35)</sup>。萎縮病毒是由蚜蟲(*Pentalonia*

*nigronervosa* Conquerel)或經由香蕉營養繁殖傳播<sup>(29,86)</sup>。萎縮病在亞太地區普遍存在，在非洲只有少數國家有此病害，在拉丁美洲至今仍無發生。嚴重感染的植株，生長明顯減慢，產量全部損失。再者，至今仍未找到抗病來源。近年來香蕉條斑病毒(BSV)，香蕉苞片嵌紋病毒(BBMV)及胡瓜嵌紋病毒(CMV)的為害有增加的趨勢。BSV是一種 badnavirus，於10年前，在摩洛哥首先報導<sup>(40)</sup>，對全球香蕉產業造成新的威脅<sup>(28)</sup>。它也是一種 pararetrovirus，最近被發現能併入(integrate)在香蕉基因組中<sup>(41)</sup>。BBMV是一種 potyvirus，因缺乏可靠的鑑定技術，在菲律賓及印度對邊境防疫工作已構成嚴重威脅<sup>(5)</sup>。CMV造成植物感染性變色，在所有蕉區均存在。因其寄主廣闊，難於防治<sup>(28,75)</sup>。

在數種嚴重為害並具移動性的內寄生線蟲中(migratory endoparasitic nematode)，(例如：根腐線蟲 *Pratylenchus* spp.及螺旋線蟲 *Helicotylenchus multincinctus* (Cobb) Golden)，以穿孔線蟲(*Radopholus similis* (Cobb) Thorne 最為危險<sup>(33)</sup>)。此種線蟲在拉丁美洲的蕉園成爲日益嚴重的問題。細菌性枯萎病(Moko disease)是由細菌 *Pseudomonas solanacearum* (最近Yabunchi 等人<sup>(93)</sup>研議將其移至新屬 *Burkholderia*) 所引起，在潮濕地區造成嚴重損害。在某些地區，由*Erwinia carotovora* 引起的細菌性塊莖軟腐病成爲嚴重的問題。同樣地，象鼻蟲(*Cosmopolites sordidus* Germar)<sup>(56)</sup>在假莖基部產卵，其幼蟲鑽入地下塊莖中，在某些地區，尤其是非洲，造成嚴重損害。

## 香蕉生物技術研究

有關香蕉生物技術的研究已有不少回顧報告<sup>(18,20,22,53)</sup>，本文只討論有關這方面的最新發展。

### 一、細胞及原生質體試管培養

香蕉試管繁殖在1970年代早期開始<sup>(44)</sup>。至1980年代，已普遍使用，成為各種香蕉品種的繁殖技術<sup>(77,88)</sup>。但是，只有少許報告報導較複雜的培養技術：包括體胚培養及胚性細胞懸浮培養(ECSs)<sup>(60)</sup>。現今，在香蕉體胚培養技術中，有三種不同程序：使用營養組織，例如以塊莖和葉基<sup>(54)</sup>，離體培養的分生組織<sup>(26)</sup>及未成熟的雄花序<sup>(31)</sup>來進行。因食用香蕉很少具有種子，使用這些方法比從前以未成熟的合子胚進行<sup>(21,30,45)</sup>較為進步。據報導，以上三種程序或有不同成效，但均可藉由體胚發生(somatic embryogenesis)再生植株。從組織學顯示，體胚發生的過程與所用的培植體有關<sup>(74)</sup>。因此，以繁殖中的分生組織<sup>(27)</sup>或以未成熟雄花序<sup>(19)</sup>來建立長期胚性細胞懸浮培養(ECSs)，是可行的方法。同樣地，原為莖頂培養繁殖設計的短暫淹沒培養系統(temporary immersion culture system)<sup>(2)</sup>，可用作體胚增殖(J.V. Escalant, pers. comm.)及維持香蕉細胞懸浮液<sup>(74)</sup>。

Dhed'a 等人<sup>(26)</sup>成功地利用細胞懸浮培養進行超低溫保存。幾個栽培種包括 'Bluggoe' 及 *Musa balbisiana* Colla 的 ECSs，經過以液態氮保存的超低溫處理，仍有很高的成活率(90-94%)<sup>(58)</sup>。使超低溫保存得以成功的主要參數包括(1)以7.5%濃度的 dimethylsulfoxide 作為超低溫保護劑(cryoprotectant)；(2)以每分鐘降低1°C的緩慢速度降溫至-40°C；(3)在緩速冷凍過程中，將溫度降至-10°C，以引發結冰(ice crystallization)現象。以螢光染劑(fluorescein diacetate)染色反應顯示，只有高度胚性細胞能在冷凍中存活，並能以體胚發生再生植株<sup>(57)</sup>。至目前為止，ECSs 是用在超低溫保存的唯一材料。然而，在最新報告中，利用離體分生組織及體胚為材料<sup>(1,61)</sup>，均能在超低溫保存中成活，不過其成活率只有40-50%，不及 ECSs。

與其他單子葉植物相似，ECSs 的發展，成爲分離具有高度胚性潛力的香蕉原生質體的唯一途徑。因此，早期以各種分化組織進行原生質體培養，成功有限<sup>(60)</sup>。Megia 等人<sup>(49)</sup>首先描述如何利用香蕉ECS進行原生質體分離。但是，只觀察到細胞的不斷分裂和癒合組織的發生。Panis 等人<sup>(59)</sup>報導，在煮食蕉栽培種'Bluggoe'，可直接由體胚發生過程再生大量植株。此外，利用香蕉胚性細胞作爲供養層(feeder layer)來進行原生質體培養或只以高密度原生質體( $10^6\text{ml}^{-1}$ )進行平板培養，均可大大提高平板培養的效率至20-40%。另一組研究者，亦有相同的發現<sup>(50)</sup>。

## 二、基因轉形及轉殖香蕉

隨著胚性細胞懸浮及原生質體培養的發展，可使外來基因引入香蕉中。利用粒子射擊香蕉ECSs，可產生大量基因轉殖植株<sup>(70,71)</sup>。最近報導，使用農桿菌(*Agrobacterium*)作媒介進行香蕉分生組織轉形，亦可產生基因轉殖植株<sup>(47)</sup>。

目前在香蕉中，可行的基因轉形系統有三：(1)利用電穿孔法(electroporation)，把 DNA 導入由細胞懸浮液產生的原生質體<sup>(71)</sup>。(2)使用自製的粒子槍，進行粒子射擊 ECSs，能達到最高轉形效果<sup>(70,71)</sup>，及(3)以農桿菌爲媒介使離體分生組織轉形<sup>(47)</sup>。各系統簡述如下：

### 1. 電穿孔法處理香蕉原生質體及其短暫基因表現

以電穿孔法處理煮食蕉栽培種'Bluggoe'的胚性細胞懸浮液，藉分離出的原生質體，檢定導入DNA的短暫表現，從而找出應用電穿孔法的條件。當使用960  $\mu\text{F}$ 電容時，其他參數爲(1)電場強度爲 $800\text{Vcm}^{-1}$ ；(2) ASP電穿孔緩衝液含70mM potassium-aspartate, 5mM calcium-gluconate, 5mM MES及0.55M mannitol (pH5.8)<sup>(80)</sup>；(3) PEG (polyethylene glycol)濃度爲5%；(4)加入PEG前，在45°C進行熱擊(heat shock)處理需時五分鐘；(5)使用從培養一星期的細胞懸浮液中分離出具高活性的原生質體；(6)構築達到最高表現的鑲嵌基因。利用原位測定方式檢定 *gusA* 基因的短暫表現，顯示導入 DNA 的最高頻率約爲全部原生質體的2%<sup>(69)</sup>。

此法可作爲分析香蕉啓動子的根據<sup>(72)</sup>，並且應用前述的植株再生程序(protocol)，將可產生基因轉殖植株<sup>(59)</sup>。

## 2. 粒子射擊胚性細胞懸浮液

為使外來基因在香蕉細胞中達到最高表現，需要找出其啓動子。為此，選出曾在單子葉植物中使用過的異源啓動子，在其控制下測試 *gusA* 基因的短暫表現。使用改良型粒子槍<sup>(70)</sup>，把帶有加強型 CaMV35S 啓動子及苜蓿嵌紋病毒未轉譯的領導序列啓動子(35S-35S-AMV)<sup>(23)</sup>，打進香蕉細胞，每次射擊大概可看到1000個藍色焦點(約25mg 細胞)。此短暫轉型率的高度表現與其他單子葉植物在 ECSs 中的試驗相似(表1)。基因轉形頻率的增加與表現率的提昇有密切關連，而藍色焦點似乎比其他構築有更快及更強的表現。從 GUS 螢光分析法，也確認 35S-35S-AMV 驅動GUS的表現，比重組 Emu 啓動子高達二倍左右<sup>(39)</sup>。從其他單子葉植物中分離的啓動子，例如水稻的 *Act1*<sup>(95)</sup>及玉米 ubiquitin 的啓動子<sup>(14)</sup>，在香蕉胚性懸浮細胞更爲活躍<sup>(70)</sup>。

表 1. 以粒子射擊單子葉植物胚性懸浮細胞產生暫時基因轉形頻率的比較

Table 1. Comparison of transient transformation frequencies of particle bombardment in embryogenic suspensions of monocot species

品種 Species	藍色焦點數/mg鮮重 Number of blue foci/mg fresh weight	文 獻 References
大麥 Barley	7000/1000	(67)
玉米 Maize	8700/100	(87)
水稻 Rice	422/300	(91)
小麥 Wheat	880/100	(87)
香蕉 Banana	1000/25	(70)

以帶有 *gusA* 及 *hph* (一種使抗生素 hygromycin 不活化的酵素 hygromycin phosphotransferase 的基因)嵌合基因的載體射擊栽培種 'Bluggoe'的胚性細胞懸浮液，並進行 hygromycin 抗性篩選。在選擇培養基中

培養兩個月後，出現具有 GUS-陽性反應的細胞團。具 hygromycin 抗性的植株經再生及溫室種植後，其葉片及根均呈 GUS-陽性反應。在對照植株的相同組織中，則呈陰性反應。至今，並無證據顯示嵌合體發生的現象，可能是因為源於單細胞再生的植株所致。以 PCR 分析抗 hygromycin 植株的 DNA，顯示有正確的放大產物存在，其產物與 *hph* 基因密碼區相當。在非轉形的對照植株中，則無此反應；而在用作轉形用的質體 DNA，則有此產物。再者，以南方氏雜交分析 PCR 產物，無論是經過限制酶切割或未經限制酶切割的基因組DNA中，均證實為原來的基因，並已確實併入在基因組內<sup>(70)</sup>。

這三項的證據，包括(1) hygromycin 抗性表現型，(2) *gusA* 基因在不同植物組織中的穩定表現及(3)引入基因併入在轉形植株基因組中，均證明這些再生植株是真正的基因轉殖植株。

使用此技術，已產生數百株不同的基因轉殖系，並將進行田間試驗，測定其一致性。在此技術被廣泛應用之前，必須先了解體細胞變異的存在及其發生頻率。經微體繁殖後，異型植株的出現，在許多香蕉栽培種中均有報導<sup>(65)</sup>。在鮮食用的香蕉組織培養植株中，可看到體細胞染色體數目的變異<sup>(73)</sup>。雖沒有文獻顯示體細胞變異在細胞懸浮液的再生期(generative phase)出現的情況，但在一些栽培種中，包括 'Williams' 及 'Three Hand Planty'，經由 ECS 營養期產生的植株，其體細胞變異發生率低於由一般微體繁殖的植株<sup>(74)</sup>( R.Swennen,pers. comm.)。

(譯者按：Becker 等人已成功地建立以粒子鎗射擊法的轉形系統。利用粒子鎗把帶有 GFP 及 *apt II* 基因及其相關啟動子的質體射擊到 'Grand Nain' 的懸浮細胞，獲得轉殖植株。成功率平均為每次射擊可產生約24株轉殖植株<sup>(6)</sup>)。

### 3. 經由農桿菌(*Agrobacterium-mediated*)進行分生組織轉形

以農桿菌為媒介的香蕉轉形系統，乃利用 'Grand Nain' 試管小苗的莖頂或塊莖分生組織進行。先用沒有包裹的粒子進行微粒射擊，以傷害分生組織。再經一段復元時期，把分生組織與農桿菌共同培養。農桿菌攜有植物轉形載體 pBI141，並加 acetosyringone 作為農桿菌致病性誘發物質。此外，轉形載體帶有 *gusA* 及 *neo* 嵌合基因，後者能產生 Kanamycin 抗性。由此試驗，產生大量抗 Kanamycin 植株。經南方氏雜交試驗證明：(1)在再生植株中，所有測

試組織均含有轉殖基因；(2)轉殖基因已經嵌入高分子量的基因組 DNA 中；(3)沒有農桿菌殘留在植株中。再者，經過數代的繁殖，這些植株繼續維持其基因型及表現型的特性<sup>(47)</sup>。此法引人注意之處在於(1)容易並能迅速再生基因轉殖植株；(2)不需高科技的儀器或原生質體再生技術；(3)想要的 DNA 序列能準確地轉移至接受細胞中。不過，在廣泛應用此技術之前，必須先評估此技術對基因型的特殊性及產生鑲嵌性轉形體的風險。

(譯者按：Perez Hernandez 等人於不同香蕉細胞懸浮液中，使用農桿菌法進行基因轉形試驗，利用蜂群洋菜平板培養法(swarm agar plate system)的化學趨性(chemotaxis)，加強農桿菌在植物組織的趨向，增加轉殖效果。利用此法的成功率比粒子鎗法高達10倍之多<sup>(62)</sup>)。

## 應用及展望

### 一、抗病蟲害

真菌病害對香蕉產業造成極大損害，而其寄主抗病基因至今仍未鑑定。因此，首要的目標為探討能轉譯抗真菌所需之蛋白質的異源基因，並了解這些基因在香蕉中的表現<sup>(9)</sup>。最近發現的抗真菌蛋白質(antifungal proteins, AFPs)，可算是最有希望的選擇<sup>(8,11, 13,55,82)</sup>。該類蛋白質性狀穩定，由不同植物的種子分離獲得，為富含胱胺酸(cysteine)的小型蛋白。這些 AFPs 具有廣效性，對香蕉各種重要病害的病原真菌，例如 *Mycosphaerella fijiensis* 及 *Fusarium oxysporum* 均顯出高抗作用。同時，對人類及香蕉細胞沒有任何毒害<sup>(12)</sup>。與 AFPs相當的 cDNA 株系已從莧菜類<sup>(24)</sup>，蘿蔔<sup>(83)</sup>及洋蔥<sup>(13)</sup>中分離出來。最近，其中一個 AFP 構築已在基因轉殖的煙草植株中，表現其作用，增強對 *Alternaria longipes* 的抗性<sup>(83)</sup>。預期藉著 AFPs 在基因轉殖植株中的表現，加上從細胞學及超微結構分析真菌與植株間的交互作用<sup>(7)</sup>，可進一步明瞭在植株中病害感染及病徵發展的過程。再者，AFPs' 對組織的特殊及高度表現，可產生商業用的香蕉抗病品種。

(譯者按：近年來，Remy 等人使用粒子鎗法已成功地把帶有抗微生物蛋白質(Anti-microbial protein)基因的粒子轉殖到香蕉中。並用 PCR/南方氏雜交分



析，RT-PCR/北方雜交分析及 ELISA 測定，證明轉殖基因在轉殖植株中的穩定性及表現。並以葉圓片(leaf disc)接種病原菌，證明轉殖植株對葉斑病有抗性效果<sup>(64)</sup>。)

抗萎縮病(BBTV)是另一個香蕉分子育種的目標。最近，Harding 等人<sup>(34)</sup>及 Thomas 和Dietzgen<sup>(85)</sup>已分離出類病毒粒子(直徑為18-20nm)，並指出一小段 ssDNA 與純化的病毒粒子有關連性。此外，利用選殖 DNA 探針<sup>(34)</sup>及具病毒特殊性的單株抗體<sup>(85)</sup>，證明該 DNA 與萎縮病及其傳播有密切關係。BBTV 基因組由六個不同的單股 DNA 成份組成，均已經被選殖和定序，在這些組成中，只有一個含有一個解碼框架(ORF, open reading frame)<sup>(10)</sup>。Harding 等人<sup>(34)</sup>認為其中一個 ORF 可能是複製酶基因，可改造為具有核糖酶作用(ribozyme technology)，能阻止 BBTV 在香蕉中複製(J.L. Dale, pers.comm.)。最近，BBTV 的不同組成，亦由另一研究組分離並確認以上的發現<sup>(94)</sup>。不過，BBTV 可能有兩個不同品系：亞洲型及南太平洋型<sup>(37,92)</sup>，所以，需要不同的構築來產生抗性。

最近，香蕉 BMV 的外鞘蛋白質之C-末端區及未轉譯的3'末端區的複製技術已發展成功<sup>(5)</sup>，對由病毒獲得抗性的研究，開創新的機會。有關基因轉型的試驗，現正朝這方向發展。

基因轉移也可成為抗線蟲的育種工具。基本途徑有三：(1)藉溶解酶(lytic enzyme)或殺線蟲蛋白質(nematicide protein)的表現，在基因轉殖香蕉中，直接殺死線蟲；(2)選殖植物抗線蟲異源基因，使之表現抗性；(3)藉轉殖基因的表現，干擾線蟲與植物間的交互作用，例如產生一種蛋白質，可阻礙線蟲對植物的認識，或產生異源植物抗體(plantibodies)以抑制由線蟲分泌的一些重要蛋白質<sup>(25)</sup>。目前，以第一個策略較為可行，因為至今仍未找到抗線蟲基因，而線蟲與植物間的交互作用仍未明瞭。

## 二、果產品質控制

在過去八年來，應用現代分子生物技術，已產生具有加強果實成熟特性的基因轉殖番茄<sup>(38)</sup>。在1994年，經 FDA (Food and Drug Administration) 的准許，Calgene 公司推出名為 FlavrSavr™ 的新品種，含有能阻止果實軟化酶

作用的轉殖基因，數種發展這些番茄品種的技術，應可直接應用在其他鮮果類作物。

最明顯的研究目標，為藉遺傳工程改變香蕉乙烯生合成的途徑<sup>(16)</sup>。香蕉屬更年性水果，意即在任何成熟期，可用乙烯誘導使之成熟。若減緩香蕉乙烯的生物合成，可延長香蕉的儲存期，對生產者及消費者均有益處。對消費者而言，香蕉可在適當熟度保持較長時間；對生產者或運銷業者，可減少因早熟黃化所引致的損失。再者，一些因不耐運銷而無商品價值的香蕉，可成為新產品而銷售。減低乙烯產生，更可減少因病害或機械損傷所引起致害的生化或生理反應。

其他可增加香蕉果產價值特性的包括(1)改變碳水化合物在果實成熟時的生化過程，可增加產量，或使澱粉/糖類互換，以達到適合鮮食或煮食的需求；(2)阻止果肉或果皮因不當處理或逆境造成，由酚類化合物所致的褐化；(3)藉使用外來基因或合成具有高營養價值的多勝素的表現，增加某些胺基酸(例如甲硫胺酸(methionine))的含量，以提高香蕉的營養價值。

對香蕉果實成熟時，其生化或生理過程中改變基因的有關表現，本文作者及其同僚作了深入的研究，並獲得基本的了解。最近Clendennen 和 May<sup>(15)</sup>及 Medina-Suarez 等人<sup>(48)</sup>發表在香蕉成熟開始前後，香蕉果肉 cDNA 庫差別篩選(differential screening)的結果。他們分離並鑑定在果實成熟過程中，有不同表現的轉錄體(transcripts)。目前工作的方向是分離基因的調節因子及其特性鑑定。

從香蕉果肉中已分離出一個豐富的 31kDa(p31)蛋白質，並對之進行特性鑑定<sup>(42)</sup>。使用胺基末端(amino-terminal)序列分析，及比較蛋白質資料庫中的純化 p31，結果顯示，這些蛋白質與從前鑑定的幾丁質酶(chitinase)是同源。利用兔子抗-p31 抗體進行西方雜交分析，證明這蛋白質主要存於果肉。從專屬果肉的 cDNA 庫中，以差別篩選法分離出一段 p31 的 cDNA，並以從成熟果肉分離出來的 RNA 進行北方雜交分析，結果顯示，這 cDNA 片段在未成熟果肉中有高度表現，但在成熟果肉中，這個轉錄體的含量隨即減少。再者，含有5'近端及 p31 結構密碼的基因組選殖系已經被分離及鑑定。這些啟動子，將有助研究外來蛋白質，在轉殖香蕉中早期果實的特殊表現。

(譯者按：最近 Clendenen 等人已分離出三個 cDNA 片段(PEL,G1A及G8A)，均具果實特殊性，並在果實成熟期大量表現。使用北方雜交分析證明它們的轉錄體有相同的特性。現正深入尋找其調節基因<sup>(17)</sup>。近年來國立台灣大學黃鵬林及其同僚正積極進行後熟基因轉型研究)。

### 三、製藥應用

Lyons 等人<sup>(43)</sup>描述香蕉分子生物技術的另一應用：生產藥用的功能性蛋白質及胜肽。

數種重組疫苗已能在基因轉殖植株中產生。首先為用作疫苗的 B-型肝炎表面抗原(HBsAg)<sup>(46)</sup>，現已證明在基因轉殖煙草植株能產生重組 HBsAg(rHBsAg)。同時，用免疫親和性純化技術(immuno-affinity purification)及電子顯微鏡，均證明這些 rHBsAg 可以聚集成為擬病毒粒子(VLPs)。進一步試驗顯示，以源自植物的 VLPs 注射老鼠，這些蛋白質能保持其免疫特性<sup>(84)</sup>。經注射後，其免疫反應與商業用疫苗的效果相似(Recombivax, Merck Sharpe and Dohmne)。根據這些研究室的深入觀察，顯示以含有其他疫苗表現的馬鈴薯塊根飼食老鼠，會產生免疫反應<sup>(81)</sup>。本文作者期望以基因轉殖香蕉作成口服疫苗來預防腹瀉(diarrheal)<sup>(66)</sup>及其他疾病(C.J. Arntzen, pers.comm.)。

### 致 謝

得原文作者Dr. R. Swennen 及出版社Intercept Ltd. 允許翻譯，謹此致謝。

## 參考文獻

1. Abdelnour-Esquivel, A. and J.V. Escalant. 1994. Cryopreservation of somatic embryos of *Musa Grand Naine*(AAA). The 11th ACORBAT Meeting, San Jose, Costa Rica. (Abstract).
2. Alvard, D., F. Cote, and C. Teissen. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 32:55-60.
3. Anonymous. 1994. FAO Trade Yearbook 1993. FAO, Rome.
4. Anonymous. 1995. FAO Production Yearbook 1994. Vol.48. FAO, Rome.
5. Bateson, M.F. and J.L. Dale. 1995. Banana bract mosaic virus:characterisation using potyvirus specific degenerate PCR primers. *Arch. Virol.* 140:515-527.
6. Becker, D.K., B. Dugdale, M.K. Smith, R.M. Harding, and J.L. Dale. 1999. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. 'grand nain' via microprojectile bombardment. *Infomusa* 8(1):XII-XIII(Abstract).
7. Beveraggi, A., X. Mourichon, and G. Salle. 1993. Study of host-parasite interactions in susceptible and resistant bananas inoculated with *Cercospora fijiensis*, pathogen of black leaf streak disease. *Proc. Intl. Symp. on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests.* Montpellier, France. p. 171-192.
8. Broekaert, W.F., W. Marien, F.R.G. Terras, M.F.C. De Bolle, P. Proost, J. Van Damme, L. Dillen, M. Claeys, S.B. Rees, J. Vanderleyden, and B.P.A. Commue. 1992. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry* 31:4308-4314.
9. Broekaert, W.F., B.P.A. Cammue, M. De Bolle, K. Thevissen, G. De Samblanx, and R.W. Obsorn. 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Rev. Plant Sci.* 16:297-323.
10. Burns, T.M., R.M. Harding, and J.L. Dale. 1995. The genome organization of

- banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components. *J. Gen. Virol.* 76:1471-1482.
11. Cammue, B.P.A., M.F.C. De Bolle, F.R.G. Terras, P. Proost, J. Van Damme, S.B. Rees, J. Vanderleyden, and W.F. Broekaert. 1992. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. of Biol. Chem.* 267: 2228-2233.
  12. Cammue, B.P.A., M.F.C. De Bolle, F.R.G. Terras, and W.F. Broekaert. 1993. Fungal disease control in *Musa*: application of new antifungal proteins. *Proc. Intl. Symp. on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests.* Montpellier, France. p. 221-225.
  13. Cammue, B.P.A., K. Thevissen, M. Hendriks, K. Eggermont, I.J. Goderis, P. Proost, J. Van Damme, R.W. Osborn, F. Guerbette, J-C. Kader, and W.F. Broekaert. 1995. A potent antimicrobial protein from onion (*Allium cepa* L.) seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 109: 445-455.
  14. Christensen, A.H. and P.H. Quail. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 5:213-218.
  15. Clendennen, S.K. and G.D. May. 1997. Differential gene expression in ripening banana (*Musa acuminata* cultivar Grand Nain) fruit. *Plant Physiol.* 115:463-469.
  16. Clendennen, S.K., P.B. Kipp, and G.D. May. 1997. The role of ethylene in banana fruit ripening. *Proc. of the NATO Advanced Research Workshop on Biology and Biochemistry of the Plant Hormone Ethylene.* Crete, Greece. p.141-148.
  17. Clendennen, S. K. , J.A. Kellogg, C.B. Phan, N.M. Webb, V.R. Bommineni, H. Mathews, and D. Ry Wagner. 1999. Characterization of fruit-specific transcripts and their associated promoters in Cavendish banana. *Infomusa* 8(1):VIII-IX(Abstract).
  18. Cote, F.X., J.A. Sandoval, P. Marie, and E. Auboiron. 1993. Variations in micropropagated bananas and plantains: literature survey. *Fruits* 48:11-18.

19. Cote, F.X., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schwendiman, C. Teisson, and J.V. Escalant. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cultivar Grand nain. *Physiol. Plant.* 97: 285-290.
20. Cronauer, S.S. and A.D. Krikorian. 1986. Banana (*Musa* spp.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. p. 233-252.
21. Cronauer, S.S. and A.D. Krikorian. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Rep.* 7:23-25.
22. Dale, J.L. 1990. Banana and plantain. In: Persley, G.J. (ed.). *Agricultural Biotechnology: Opportunities for International Development*. CAB International, Wallingford, England. p. 225-240.
23. Dalta, R.S.S., F. Bekkaoui, J.K. Hammerlindl, G. Pilate, D.I. Dunstan, and W.L. Crosby. 1993. Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence. *Plant Sci.* 94:139-149.
24. De Bolle, M.F.C., K.M.M. David, S.B. Rees, J. Vanderleyden, B.P.A. Commue, and W.F. Broekaert. 1993. Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial chitin-binding protein from amaranth, *Amaranthus caudatus*. *Plant Mol. Biol.* 22: 1187-1190.
25. De Waele, D., L. Sagi, and R. Swennen. 1994. Prospects to engineer nematode resistance in banana. *Proc. of a Conference-Workshop on Nematodes and Weevil Borers Affecting Bananas in Asia and the Pacific*. INIBAP/ASPNET, Los Banos, Philippines. p. 204-216.
26. Dhed'a, D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke, and E. De Langhe. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cultivar 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135.
27. Dhed'a, D. 1992. Culture de suspensions cellulaires embryogeniques et regeneration en plantules par embyogenese somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.). Ph.D. thesis, Katholieke Universiteit Leuven,

- Belgium. 167pp.
28. Diekmann, M. and C.A.J. Putter (Eds). 1996. *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No.15. Musa. 2<sup>nd</sup> edn*, FAO/IPGRI, Rome, Italy.
  29. Drew, R.A., J.A. Moisaner, and M.K. Smith. 1989. The transmission of banana bunchy top virus in micropropagated bananas. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 28: 203-205.
  30. Escalant, J.V. and C. Teisson. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Rep.* 7:665-668.
  31. Escalant, J.V., C. Teisson, and F. Cote. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Devel. Biol.* 30P: 181-186.
  32. Fromm, M., L.P. Taylor, and V. Walbot. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Nat. Acad. of Sci., USA* 82:5824-5828.
  33. Gowen, S. and P. Queneherve. 1990. Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. In : Luc, M., R.A. Sikora and J. Bridge (eds.) *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, England. p.431-460.
  34. Harding, R.M., T.M. Burns, and J.L. Dale. 1991. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. *J. Gen. Virol.* 72:225-230.
  35. Harding, R.M., T.M. Burns, G. Hafner, R.G. Dietzgen, and J.L. Dale. 1993. Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene. *J. Gen. Virol.* 74: 323-328.
  36. Horigome, T., E. Sakaguchi, and C. Kishimoto. 1992. Hypocholesterolaemic effect of banana (*Musa sapientum* L. var. Cavendishii) pulp in the rat fed on a cholesterol-containing diet. *British J. Nutrition* 68: 231-244.

37. Karan, M., R.M. Harding, and J.L. Dale. 1994. Evidence for two groups of banana bunchy top virus isolates. *J. Gen. Virol.* 75: 3541-3546.
38. Klee, H. 1993. Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. *Plant Physiol.* 102: 911-916.
39. Last, D.I., R.I.S. Brettell, D.A. Chamberlain, A.M. Chaudhury, P.J. Larkin, E.L. Marsh, W.J. Peacock, and E.S. Dennis. 1991. pEmu: an improved promoter for gene expression in cereal cells. *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588.
40. Lockhart, B.E.L. 1986. Purification and serology of a bacilliform virus associated with banana streak disease. *Phytopathology* 76: 995-999.
41. Lockhart, B.E.L. 1996. Developing methods to detect banana streak virus in *Musa*. In : INIBAP Annual Report 1995. INIBAP, Montpellier, France. p.14.
42. Lopez-Gomez, R., S.K. Clendennen, and M. Gomez-Lim. 1998. The abundant 31-kilodalton banana pulp protein is homologous to class-III acidic chitinases. *Phytochemistry* 47:613-619.
43. Lyons, P.C., G.D. May, H.S. Mason, and C.J. Arntzen. 1996. Production of protein pharmaceuticals in transgenic plants. *Pharma. News* 3: 7-12.
44. Ma, S.S. and C.T. Shii. 1972. *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 18: 135-142.
45. Marroquin, C.G., C. Paduscheck, J.V. Escalant, and C. Teisson. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In Vitro Cell. Devel. Biol.* 29P: 43-46.
46. Mason, H.S., D.M.K. Lam, and C.J. Arntzen. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.,( USA)* 89: 11745-11749.
47. May, G.D., A. Rownak, H. Mason, A. Wiecko, F.J. Novak, and C.J. Arntzen. 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technology* 13: 486-492.
48. Medina-Suarez, R., K. Manning,, J. Fletcher, J. Aked, C.R. Bird, and G.B. Seymour. 1997. Gene expression in the pulp of ripening banana: Two-



- dimensional SDS PAGE of *in vitro* translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115: 453-461.
49. Megia, R., R. Haicour, L. Rossignol, and D. Sihachakr. 1992. Callus formation from cultured protoplasts of banana (*Musa* sp.). *Plant Sci.* 85: 91-98.
50. Megia, R., R. Haicour, S. Tizroutine, V. BuiTrang, L. Rossignol, D. Sihachakr, and J. Schwendiman. 1993. Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cultivar Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). *Plant Cell Rep.* 13: 41-44.
51. Mobambo, K.N., F. Gauhl, D. Vuylsteke, R. Ortiz, C. Pasberg-Gauhl, and R. Swennen. 1993. Yield loss in plantain from black sigatoka leaf spot and field performance of resistant hybrids. *Field Crops Research* 35: 35-42.
53. Novak, F.J. 1992. *Musa* (bananas and plantain). In : F.A. Hammerschlag and R.E. Litz (eds.), *Biotechnology in Perennial Fruits*. CAB International, Wallingford, England. p. 449-488.
54. Novak, F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Conger, and X. Tang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA or AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology* 7: 154-159.
55. Osborn, R.W., G.W. De Samblanx, K. Thevissen, K. Goderis, S. Torrekens, F. Van Leuven, S. Attenborough, S. Rees, and W.F. Broekaert. 1995. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastaneaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters* 368: 257-262.
56. Ostmark, H.E. 1974. Economic insect pests of bananas. *Annual Review of Entomology* 19: 161-176.
57. Panis, B.J., L.A. Withers and E.A.L. De Langhe. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *Cryo-Letters* 11: 337-350.
58. Panis, B., D. Dhed'a and R. Swennen. 1992. Freeze-preservation of embryogenic *Musa* suspension cultures, In : Adams , R.P. and J.E. Adams (eds.).

- Conservation of Plant Genes. Academic Press, New York, U.S.A. p. 183-195.
59. Panis, B., A. Van Wauwe, and R. Swennen. 1993. Plant regeneration through somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Rep.* 12: 403-407.
60. Panis, B., L. Sagi, and R. Swennen. 1994. Regeneration of plants from protoplasts of *Musa* species (banana). In :Baja, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.29. Plant Protoplasts and Genetic Engineering V.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. p. 100-112.
61. Panis, B., N. Totte, K. Van Nimmen, L.A. Withers, and R. Swennen. 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem culture after preculture on sucrose. *Plant Science.* 121: 95-106.
62. Perez Hernandez, J.B., R. Swennen, V. Galan Saucó, and L. Sagi. 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of banana embryogenic cell suspension cultures. *Infomusa* 8(1):XIII(Abstract).
63. Ploetz, R.C. 1990. *Fusarium wilt of Banana.* APS Press, St. Paul, MI, U.S.A.
64. Remy, S., I. Deconinck, R. Swennen, and L. Sagi. 1999. Development of a leaf disc assay to assess fungal tolerance in banana. *Infomusa* 8(1):XV(Abstract).
65. Reuveni, O., Y. Israeli, and E. Lahav. 1996. Somaclonal variation in banana and plantain (*Musa* species). In :Baja, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.36. Somaclonal Variation in Crop Improvement II.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. p. 174-196.
66. Richter, L., H.S. Mason, and C.J. Arntzen. 1996. Transgenic plants created for oral immunization against diarrheal disease. *J. Travel Med.* 3: 52-56.
67. Ritala, A., L. Mannonen, K. Aspegren, M. Salmenkallio-Marttila, U. Kurtun, R. Hannus, J. Mendez Lozano, T.H. Teeri, and V. Kauppinen. 1993. Stable transformation of barley tissue by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 12: 435-440.
68. Rowe, P.R. 1994. Banana plant 'FHIA-01'. US Patent No.PP8983.
69. Sagi, L., S. Remy, B. Panis, R. Swennen, and G. Volckaert. 1994. Transient

- gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cultivar 'Bluggoe', ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Rep.* 13: 262-266.
70. Sagi, L., B. Panis, S. Remy, H. Schoofs, K. De Smet, S. Remy, R. Swennen, and B.P.A. Cammue. 1995a. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Bio/Technology* 13. 481-485.
71. Sagi, L., S. Remy, B. Verelst, B. Panis, B.P.A. Cammue, G. Volckaert, and R. Swennen. 1995b. Transient gene expression in transformed banana (*Musa* spp., cultivar 'Bluggoe') protoplasts and embryogenic cell suspensions. *Euphytica* 85:89-95.
72. Sagi, L., S. Remy, B. Verelst, R. Swennen, and B. Panis. 1995c. Stable and transient genetic transformation of banana (*Musa* spp.) protoplasts and cells. In : Bajaj, Y.P.S.(ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 34. *Plant Protoplasts and Genetic Engineering VI*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. p. 214-227.
73. Sandoval, J.A., F.X. Cote, and J. Excoute. 1996. Chromosome number variation in micropropagated true-to-type and off-type banana plants (*Musa* AAA Grande Naine cultivar). *In Vitro Cell. Devel. Biol.* 32P: 14-17.
74. Schoofs, H. 1997. Origin of embryogenic cells in *Musa*. Ph.D. thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. 223pp.
75. Singh, Z., R.A.C. Jones, and M.G.K. Jones. 1995. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Disease* 79: 713-716.
76. Smith, E.F. 1910. A Cuban banana disease. *Science* 31: 745.
77. Smith, M.K. and R.A. Drew. 1990. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. *Australian Journal of Plant Physiology* 17,:267-289.
78. Stover, R.H. 1983. Effect du *Cercospora* noir sur les plantains en Amerique Centrale. *Fruits* 38: 326-329.
79. Sun, E.J., H.J. Su, and W.H. Ko. 1978. Identification of *Fusarium oxysporum*

- f.sp. *cubense* Race 4 from soil or host tissue by cultural characters. *Phytopathology* 68: 1672-1673.
80. Tada, Y., M. Sakamoto, and T. Fujimura. 1990. Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants: use of electroporation buffer lacking chloride ions. *Theor. Appl. Genet.* 80: 475-480.
81. Taq, T.A., H.S. Mason, J.D. Clements, and C.J. Arntzen. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714-716.
82. Terras, F.R.G., H.M.E. Schoofs, M.F.C. De Bolle, F. Van Leuven, S.B. Rees, J. Vanderleyden, B.P.A. Cammue, and W.F. Broekaert. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 15301-15309.
83. Terras, F.R.G., K. Eggermont, V. Kovaleva, N. Raikhel, R. Osborn, A. Kester, S.B. Rees, J. Vanderleyden, B.P.A. Cammue, and W.F. Broekaert. 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.): Their role in host defense and their constitutive expression in transgenic tobacco leading to enhanced resistance to fungal disease. *Plant Cell* 7: 573-588.
84. Thanavala, Y., Y.F. Yang, P. Lyons, H.S. Mason, and C. Arntzen. 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci., (USA)* 92: 3358-3361.
85. Thomas, J.E. and R.G. Dietzgen. 1991. Purification, characterization and serological detection of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Australia. *J. Gen. Virol.* 72: 217-224.
86. Thomas, J.E., M.K. Smith, A.F. Kessling, and S.D. Hamill. 1995. Inconsistent transmission of banana bunchy top virus in micropropagated bananas and its implication for germplasm screening. *Aust. J. Agric. Res.* 46: 663-671.
87. Vain, P., N. Keen, J. Murillo, C. Rathus, C. Nemes, and J.J. Finer. 1993. Development of the particle inflow gun. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 33: 237-246.

88. Vuylsteke, D.R. 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. In: Withers L.A. (ed.). Practical Manuals for Handling Crop Germplasm *in vitro*, Vol.2. IBPGR, Rome, Italy. p. 1-56.
89. Vuylsteke, D., R. Swennen, and R. Ortiz. 1993a. Development and performance of black sigatoka-resistant tetraploid hybrids of plantain (*Musa* spp., AAB group). *Euphytica* 65: 33-42.
90. Vuylsteke, D., R. Swennen, and R. Ortiz. 1993b. Registration of 14 improved tropical *Musa* plantain hybrids with black sigatoka resistance. *HortScience* 28: 957-959.
91. Wang, Y.C., T.M. Klein, M. Fromm, J. Cao, J.C. Sanford, and R. Wu. 1988. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* 11: 433-439.
92. Xie, W.S. and J.S. Hu. 1995. Molecular cloning, sequence analysis, and detection of banana bunchy top virus in Hawaii. *Phytopathology* 85: 339-347.
93. Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. *Microbiol. and Immunol.* 36: 1251-1275.
94. Yeh, H.H., H.J. Su, and Y.C. Chao. 1994. Genome characterization and identification of viral-associated dsDNA component of banana bunchy top virus. *Virology* 198: 645-652.
95. Zhang, W., D. McElroy, and R. Wu. 1991. Analysis of rice *Act1* 5' region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3: 1155-1165.