

感染洋桔梗之番椒葉脈斑駁病毒之分離與鑑定¹

鄭櫻慧²⁴ 陳金枝² 廖吉彥² 鄧汀欽² 張清安³

摘 要

鄭櫻慧、陳金枝、廖吉彥、鄧汀欽、張清安。2009。感染洋桔梗之番椒葉脈斑駁病毒之分離與鑑定。台灣農業研究 58:196–207。

本研究於 2004 年自嘉義縣新港鄉採集到植株略微矮化，葉片呈現黃化圓斑，疑似病毒感染之洋桔梗植株。將其接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 葉片，10 日後所出現的局部病斑經過 3 次單斑分離後將其接種於 *Nicotiana benthamiana* 保存，經回接洋桔梗後在其接種葉出現不明顯黃化圓斑，接種甜椒則出現輕微葉脈斑駁病徵。純化病毒蛋白質經 SDS-PAGE 分析，鞘蛋白分子量估計約為 31 kDa，此純化病毒並用來免疫白兔製備抗血清，作為 ELISA 檢測之用。LIS1 病毒分離株與辣椒葉脈斑駁病毒 (*Chilli veinal mottle virus*, ChiVMV) 具有血清類緣相關性，但利用 potyvirus 的簡併式引子進行反轉錄聚合酶連鎖反應以增幅其 3' 端基因體並進行選殖及定序分析，與登錄於 GenBank 之 potyviruses 比對結果發現，所分離之病毒與番椒葉脈斑駁病毒 (*Pepper veinal mottle virus*, PVMV, EU719467) 的鞘蛋白基因具有 99.3% 的相同度。綜合以上證據顯示本研究由洋桔梗所分離之 potyvirus 應為 PVMV 之一分離株，這是 PVMV 可以感染洋桔梗之首次紀錄。

關鍵詞：洋桔梗、番椒葉脈斑駁病毒。

前 言

洋桔梗 [*Eustoma russellianum* (Don.) Griseb] 原產於美國中南部內布拉斯加州 (Nebraska) 至德克薩斯州 (Texas) 一帶，屬於龍膽科 (Gentianaceae) 之宿根草本花卉。台灣自 1968 年由日本引入栽種後，近年來已快速發展為新興之切花作物，種植主要分佈於彰化、雲林及嘉義等縣。由於洋桔梗花型和花色豐富

多樣，耐貯運，其切花到消費地吸水後可快速恢復活力，平均價格每把 10 支約為百元左右，因此栽培面積和產量急速增加。近年來種植面積雖略下降，但至 2007 年種植面積仍有 59 ha，產量在 1600 萬枝以上，每年銷日的洋桔梗約 200 萬枝以上。洋桔梗是一種需要極佳技術才能栽培成功的花卉，目前國內栽培上最大的問題是苗株會因不良環境造成簇生化 (Rosette) 現象，栽培者多以購買進口苗或涼溫

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2366 號。接受日期：98 年 8 月 19 日。

2. 本所植物病理組副研究員、助理研究員、助理研究員、研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。

3. 朝陽科技大學生化研究所教授。台灣 台中縣 霧峰鄉。

4. 通訊作者，電子郵件: yhcheng@tari.gov.tw；傳真：(04)23302803。

養成苗解決。除此之外，其病害發生種類繁多，其中有關危害洋桔梗之病毒種類至少有 15 種，包括 *Ageratum yellow vein virus* (AYVV, *Begomovirus*) (Cheng *et al.* 2005)、*Bean yellow mosaic virus* (BYMV, *Potyvirus*) (Chang & Lin 1990; Gera & Cohen 1990; Lisa & Dellavalle 1987)、*Broad bean wilt virus* (BBWV, *Fabavirus*) (Chen *et al.* 2000, 2002; Iwaki *et al.* 1987)、*Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*) (Chen & Hu 1999; Gera & Cohen 1990; Provvidenti 1985)、*Lisianthus necrotic virus* (LNV, *Necrovirus*) (Chen & Hsu 2002; Chen *et al.* 2001; Iwaki *et al.* 1987)、*Lisianthus line pattern virus* (LLPV, *Ilarvirus*) (Lisa *et al.* 1994)、*Tobacco mosaic virus* (TMV, *Tobamovirus*) (Gera & Cohen 1990)、*Tomato mosaic virus* (ToMV, *Tobamovirus*) (Jan *et al.* 2003)、*Tomato spotted wilt virus* (TSWV, *Tospovirus*) (Chu *et al.* 2001; Lisa *et al.* 1990; Wolcan *et al.* 1996)、*Turnip mosaic virus* (TuMV, *Potyvirus*) (Chao *et al.* 2000)、*Iris yellow spot virus* (IYSV, *Tospovirus*) (Kritzman *et al.* 2000)、*Impatiens necrotic spot virus* (INSV, *Tospovirus*) (Mc Govern *et al.* 1997)、*Sweet potato sunken vein virus* (SPSVV, *Closterovirus*) (Cohen *et al.* 2001)、*Tobacco streak virus* (TSV, *Ilarvirus*) (de Freitas *et al.* 1996)、*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, *Begomovirus*) (Cohen *et al.* 1995) 等。台灣紀錄已發生之病毒種類包含 BYMV (Chang & Lin 1990)、LNV (Chen & Hsu 2002; Chen *et al.* 2001)、BBWV (Chen *et al.* 2000)、CMV (Chen & Hu 1999)、TSWV (Chu *et al.* 2001)、TuMV (Chao *et al.* 2000)、ToMV (Jan *et al.* 2003) 及 AYVV (Cheng *et al.* 2005) 等病毒。

2004 年自嘉義縣新港鄉採集到植株略微矮化，葉片呈現黃化圓斑洋桔梗病株，利用 ELISA 偵測時，與 BYMV、BBWV、CMV、

TuMV 之抗血清皆無反應。因此對其進行病毒分離、純化及選殖定序分析之研究，最終證實其為番椒葉脈斑駁病毒 (*Pepper veinal mottle virus*, PVMV)，這是 PVMV 感染洋桔梗的首次紀錄。

材料與方法

病毒分離與寄主範圍測定

採集自新港的洋桔梗植株呈現疑似病毒感染之病徵，包括植株略微矮化及葉片出現黃化圓斑等，取其葉片以 10 倍量 (W/V) 磷酸緩衝液 (0.01 M KHPO₄, pH 7.0) 研磨後，接種於灑有 400 目金剛砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片。接種葉片出現黃斑後，切取單斑磨汁再接種於奎藜，如此重複 3 次單斑分離後，接種於 *Nicotiana benthamiana*，作為本試驗接種源，並以病葉組織置於 50% 甘油中於 -20°C 長期保存。

取罹病 *N. benthamiana* 作為接種源，依前述方法接種於藜科 (Chenopodiaceae)、龍膽科 (Gentianaceae) 和茄科 (Solanaceae) 等 3 科 9 種植物 (表 1)，置於溫室中連續觀察病徵發展 6 週，並摘取葉片進行 ELISA 檢測，確認病毒是否感染。

病毒之純化

病毒接種於 *N. benthamiana* 經過 18–20 天，採集出現病徵的葉片作為純化材料。純化方法依 Gonsalves & Ishii (1980) 之方法但略加修改進行。每克病葉加入 2 mL PE 萃取緩衝液 (0.5 M KHPO₄, pH 7.5, 0.25% Na₂SO₃, 10 mM EDTA) 以果汁機打碎，過濾後加入氯仿及四氯化碳 (各 0.5 mL/g) 淨化，經低速離心 (12,000 g, 10 分鐘) 去除綠色殘渣。上層液加入 8% PEG6000，於 4°C 下攪拌後，經低速離心 (12,000 g, 10 分鐘) 取其沉澱物，以 0.1 M PE (pH 7.0) 緩衝液懸浮，再經低速離心去除綠色殘渣。上澄液加入 8% PEG 及 0.3 M NaCl，攪

拌後經低速離心，沉澱物以 0.1 M PE 緩衝液懸浮，同樣經過低速離心去除殘渣後加入 15% (W/V) 硫酸鈉 (Cs_2SO_4)，溶解後取此溶液加至下層墊有 53% 硫酸鈉之 PE 緩衝液中，111,000 g 離心 16 小時。吸取綿密狀病毒層，以 0.1 M PE 緩衝液透析後以光譜儀 (Hitachi UV-2000 spectrophotometer) 於波長 320 nm 至 200 nm 自動掃描，並依 260 nm 波長的吸收光度計算病毒濃度。

抗血清之製備

以純化病毒為抗原，肌肉注射於紐西蘭白兔，每週注射 1 次，連續注射 4 週。病毒懸浮液 (1 mg/mL) 與等量之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 混合乳化後進行第一次注射，之後 3 次則以不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 進行乳化。第 5 週開始進行耳朵靜脈採血。採得血液於 37°C 中靜置 1 小時，低速離心使分層後吸取上層之血清，保存於 -20°C 中備用。

表 1. 番椒葉脈斑駁病毒洋桔梗分離株在供試植物上之反應

Table 1. Host reactions of *Pepper vein mottle virus* lisianthus isolate (Lis1) on tested plants

Tested plant	Reactions	
	Inoculated leaves	Systemic leaves
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium amaranticola</i>	LL ^z	-
<i>C. quinoa</i>	LL	-
Gentianaceae		
<i>Eustoma russellianum</i>	CS	CS
Solanaceae		
<i>Capsicum annuum</i>	-	Mo
<i>C. frutescens</i>	-	Mo
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	Mo
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	M, CR
<i>N. tabacum</i>	-	-
<i>Petunia × hybrida</i>	-	Mo

^z Abbreviation of symptoms: chlorotic spot (CS), crinkle (CR), local lesion (LL), mosaic (M), mottle (Mo), no symptom (-).

間接酵素連結免疫分析 (Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

本試驗參照以往之研究報告進行 (Clark & Adams 1977)，取 0.1 g 之罹病葉組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入 ELISA 反應盤內，每樣品 2 個重複，置於 37°C 生長箱 4 小時進行覆膜反應 (coating reaction)；然後以 1× PBST (137 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 1 mM Na_2HPO_4 , 0.05% Tween 20, pH 7.4) 緩衝液沖洗 3 次；其次加入病毒抗體後，放置在 37°C 定溫箱反應 2 小時；再以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次後，加入已溶於磷酸緩衝液 (137 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 1 mM Na_2HPO_4 , 0.05% Tween 20, pH 7.4) 之山羊抗兔二級抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, 100 μL /孔)，置於 37°C 之定溫箱反應 2 小時；最後再以 1× PBST 緩衝液沖洗 4 次後，再以 150 μL /孔之比例加入濃度為 1 mg/mL 之鹼性磷酸酶酵素基質 (ρ -NPP, Amresco, Solon Ind., Ohio, USA) 進行呈色反應。反應 20 至 30 分鐘，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃度高低之依據。樣品讀值大於健康葉片之 2 倍者，視為正反應。

西方漬染法 (Western blotting)

取 0.1 g 之罹病葉組織，以液態氮磨碎後，加入 200 μL 之樣品處理液 (75 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 30% glycerol, 6% SDS, 9% β -Mercaptoethanol, 0.015% Bromophenol blue)，研磨液加熱處理後經 SDS-PAGE 電泳後，膠體上之蛋白轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，之後以病毒抗血清進行漬染反應。供試材料包括：本試驗分離純化的洋桔梗病毒分離株、本實驗室分

離自甜椒之 PVMV Pep1 分離株、ChiVMV、PVY，分離自蕃茄之 PVMV Tom1 分離株、及健康對照。

RNA 之抽取及反轉錄-聚合酶連鎖反應

取 100 mg 的病葉，利用總量 RNA 純化試劑組 (Total RNA extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany) 進行 RNA 之萃取。以純化所得之 RNA 進行反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)，RT-PCR 以單一步驟 RT-PCR 試劑組 (Genemark Co., Taichung, Taiwan) 進行，25 μ L 的反應液中加入 1 μ L 的 RNA、各 2.5 μ L 之 20 μ M 簡併式引子 Hrp5/Pot1 (Chen *et al.* 2006)。RT-PCR 之進行於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中，設定反應程序為 50 $^{\circ}$ C 下進行反轉錄 30 分鐘，94 $^{\circ}$ C 變性 1.5 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94 $^{\circ}$ C 下變性 1 分鐘，50 $^{\circ}$ C 下鍊合 1.5 分鐘，72 $^{\circ}$ C 下聚合 2 分鐘，最後一個循環之 72 $^{\circ}$ C 聚合反應延長為 6 分鐘。反應產物以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME USA) 進行分析。

鞘蛋白基因之選殖及分析

上述 RT-PCR 增幅所得之 1.3 kb DNA 片段以 TOPO TA-PCR II Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 進行選殖。篩選得到之選殖株抽取質體經限制酶 EcoRI 酶切確認插入 DNA 大小後，用於進行定序分析。定序反應委託明欣生物科技公司進行。定序所得之核苷酸序列以 Vector NTI Suite (InforMax Inc., Wisconsin, USA) 分析軟體進行分析，並與 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 之 GenBank 資料庫內已登錄之核苷酸與胺基酸序列進行分析比對。

結 果

寄主植物之病徵反應

於 2004 年自嘉義縣新港鄉採得葉片具有系統性黃斑的洋桔梗葉片 (圖 1A)，經過 indirect ELISA 測試，並非受 BYMV、LNV、BBWV、CMV、TSWV、ToMV 及 TuMV 感染。利用葉片汁液機械接種於奎藜 (*C. quinoa*)，10–12 天後出現局部病斑，經 3 次單斑分離後，回接於奎藜及系統性寄主 *N. benthamiana*，此病毒分離株稱為 Lis1。以下之試驗以 *N. benthamiana* 作為試驗接種源，長期保存材料則以病葉組織浸泡於甘油：磷酸緩衝液 (1:1) 保存於 -20 $^{\circ}$ C。

機械接種 3 科 9 種植物 (表 1)，Lis1 回接洋桔梗 (*E. russellianum*) 時產生系統性黃斑，病徵與田間病徵相同 (圖 1B)。接種藜科作物之紅藜 (*C. amaranticola*) 也和奎藜一樣，只在接種葉產生單斑 (圖 1C)。接種茄科作物 *N. benthamiana* 14 天後，在心葉出現嵌紋及葉片捲曲變細等系統性病徵。接種辣椒 (*Capsicum annuum*)、甜椒 (*C. frutescens*) 和番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 都只出現不明顯的系統性斑駁病徵 (圖 1D, E)，經由 ELISA 測試皆為正反應。

病毒純化與鞘蛋白分子量測定

接種 Lis1 病毒分離株的 *N. benthamiana* 葉片經純化後所得病毒，其 A260/A280 比值為 1.20，估算病毒回收量為 4.2 mg/100 g 葉片。

以 SDS 解離純化病毒顆粒，經 12% SDS-PAGE 分析，在蛋白標誌 27–42 kDa 之間有一條帶 (圖 2)，估計其分子量約為 31 kDa。

抗體之製備與血清類緣分析

抗血清製備：純化病毒經免疫注射白兔後，共採得約 100 mL 抗血清。抗血清稀釋 100–10,000 倍進行 ELISA 時，與接種 Lis1 病

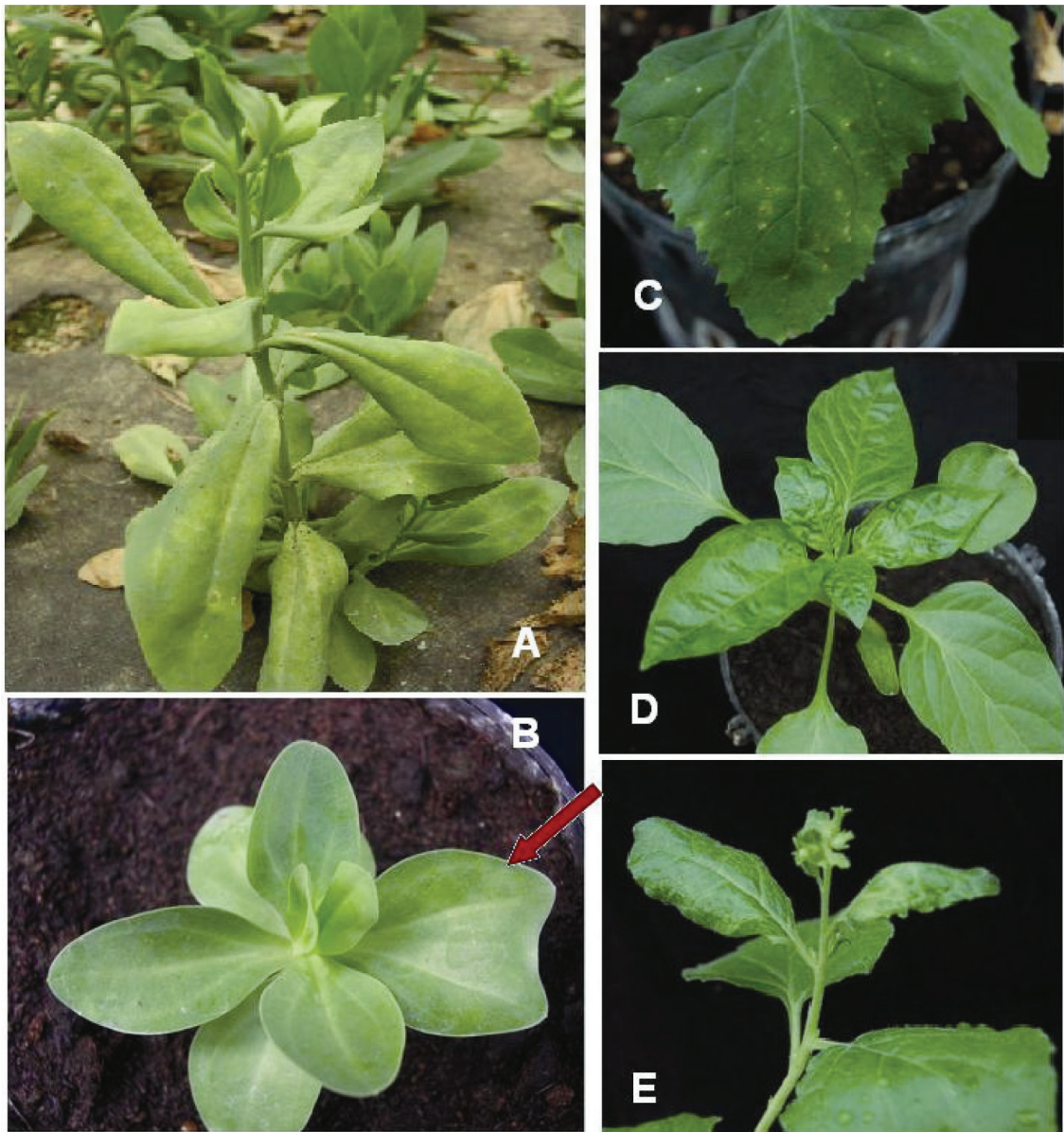


圖 1. 洋桔梗病毒分離株 Lis1 引起的病徵：(A) 田間罹病洋桔梗葉片黃化圓斑之病徵；(B) 分離病毒回接後洋桔梗之模糊黃化圓斑；(C) 紅藜接種葉產生之侷限型黃化圓斑；(D) 機械接種甜椒葉片之嵌紋與皺縮病徵；(E) 接種 *Nicotiana benthamiana* 之葉片嵌紋、下捲變形病徵。

Fig. 1. Symptoms caused by infection of lisianthus virus isolate 'Lis1'. (A) A field infected lisianthus plant showed chlorotic spots on leaves where 'Lis1' was isolated; (B) Faint chlorotic lesions developed on lisianthus seedling; (C) Local lesions showed on inoculated leaf of *Chenopodium armarenticola*; (D) 'Lis1' inoculated to *Capsicum annuum* resulted in leaf mosaic and deformation; (E) Systemic mosaic and leaf curling appeared on *Nicotiana benthamiana*.

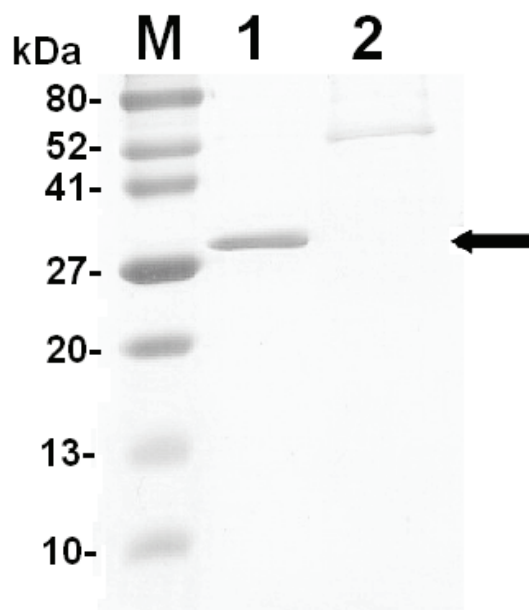


圖 2. 利用膠體電泳分析洋桔梗病毒 Lis1 之鞘蛋白。Lane 1：純化病毒；Lane 2：未接種病毒對照；M：蛋白分子量標誌。

Fig. 2. Analysis of coat protein of 'Lis1' with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoreses (SDS-PAGE). Lane 1: purified virion (2 μ g) of Lis1; Lane 2: mock-inoculated *N. benthamiana* control; Lane M: protein markers.

毒分離株的 *N. benthamiana* 呈正反應，以下實驗選擇稀釋 2000 倍進行。

間接酵素聯結免疫分析：以本實驗室製備之 ChiVMV、PVY、TuMV 及前述 Lis1 等病毒分離株製備的抗血清為抗體，與接種 Lis1 病毒的 *N. benthamiana* 葉片粗汁液 [30 倍稀釋液 (W/V) 研磨於 coating buffer] 進行間接酵素聯結免疫分析。Lis1 抗血清稀釋 10–10,000 倍時反應最好，讀值在 1.84–2.23 之間。Lis1 另與 ChiVMV 抗血清有正反應，抗血清稀釋 10–10,000 倍時讀值在 1.71–2.42 之間。Lis1 與 ChiVMV 抗血清稀釋至 100,000 倍時，A405 nm 讀值下降至 0.44 與 0.53，但仍能判別為正反應 (圖 3)。Lis1 與 PVY 及 TuMV 抗血清在本試驗無正反應。

西方漬染法：利用 Lis1 分離株製備的抗血清進行西方漬染分析，洋桔梗病毒 Lis1、PVMV Tom1 及 Pep1、ChiVMV 與 PVY 接種之煙草粗汁液都有正反應條帶，未接種病毒的植物粗汁液則無此條帶 (圖 4)。Lis1 反應條帶分子量大小與 SDS-PAGE 分析純化病毒之鞘蛋白分子量大小相似，西方漬染法中與 PVMV Tom1 及 Pep1 之條帶高度相同。Lis1 抗血清與 PVY 反應很弱，ChiVMV 條帶位置較 PVMV 高。

鞘蛋白基因之選殖與核苷酸序列分析

利用偵測 *Potyvirus* 之簡併式引子 Hrp5 和 Pot1，以接種 Lis1 的 *N. benthamiana* 葉片總量 RNA 和純化病毒的 RNA 進行 RT-PCR，反應結果以 1.2% agarose 膠體電泳分析，增幅之 DNA 片段為 0.7、1.0 和 1.4 kb 3 條帶，未接種

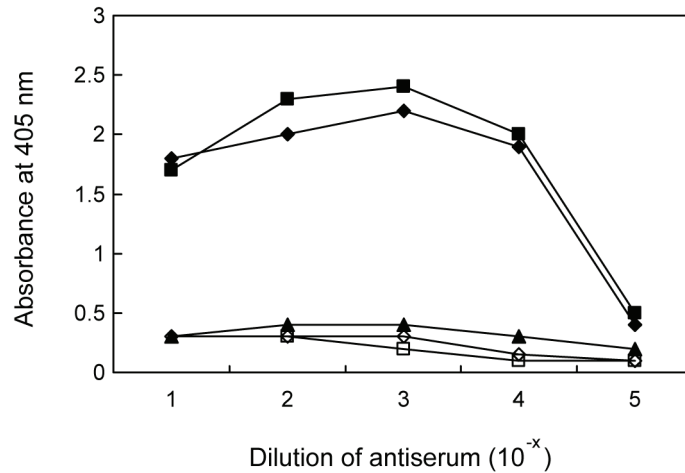


圖 3. 以間接酵素聯結免疫分析法分析洋桔梗病毒分離株 Lis1 與其他 3 種病毒間之血清類緣關係。感染 Lis1 的煙草 (*N. benthamiana*) 作為抗原，以 Lis1 (◆)、ChiVMV (■)、PVY (▲)、TuMV (◇) 之抗血清及未免疫白兔血清 (□) 系列稀釋進行 ELISA 分析。

Fig. 3. Serological relationships among the lisianthus isolate 'Lis1' and three potyviruses analyzed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Extract of 'Lis1' infected *N. benthamiana* was used as antigen. Antisera against Lis1 (◆), ChiVMV (■), PVY (▲), TuMV (◇), and normal rabbit serum (□) were serially diluted in this assay.

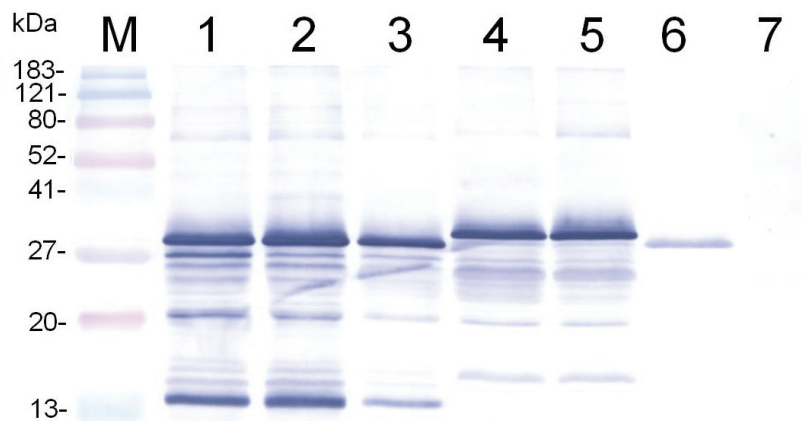


圖 4. 利用西方漬染法分析洋桔梗病毒分離株 Lis1 與其他病毒之血清類緣關係。病毒接種 *N. benthamiana* 之粗汁液做為分析樣品，分別為 Lane 1: Lis1; Lane 2: PVMV Pep1; Lane 3: PVMV Tom1; Lane 4 & 5: ChiVMV; Lane 6: PVY; Lane 7: 未接種病毒之對照; M: 蛋白分子量標誌。

Fig. 4. Western blotting analysis of lisianthus isolate 'Lis1'. Crude sap of inoculated *N. benthamiana* was used as antigen. Lane 1: 'Lis1'; Lane 2: PVMV Pep1; Lane 3: PVMV Tom1; Lane 4 & 5: ChiVMV; Lane 6: PVY; Lane 7: mock-inoculated control.

病毒之 *N. benthamiana* 葉片總量 RNA 進行之 RT-PCR 對照組則只有 0.7 和 1.0 kb 2 條帶，1.4 kb DNA 為 Lis1 感染 *N. benthamiana* 的特有條帶 (圖 5)。

增幅之 1.4 kb DNA 片段經 TOPO TA 選殖套組選殖後，所得之選植株經定序後，共有 1438 個核苷酸，包含病毒之部分 Nib 基因 (252 nt)、鞘蛋白基因 (810 nt) 和 3' 非轉譯區 (376 nt)。經 BLAST 程式比對 NCBI 之 GenBank 資料庫內登錄之序列，搜尋結果在 E 期望值均為 0 之情形下，PVMV Lis1 分離株鞘蛋白基因與 PVMV-Tom1 (EU719647) 有 99.3% 的相同度，胺基酸序列有 99.3% 的相同度，與 PVMV-Pep1 (EU719646) 有 99.1% 的相同度，胺基酸序列有 99.3% 的相同度，與 PVMV-BS (FJ617225) 有 98.8% 的相同度，胺基酸序列有 98.1% 的相同度，此三病毒株皆為台灣發現之病毒；與韓國登錄之感染茄科作物分離株鞘蛋白基因亦有 99.3% 相同度 (胺基酸具有 98.9% 相似度)，高於非洲及近東地區發現之分離株 (表 2)。

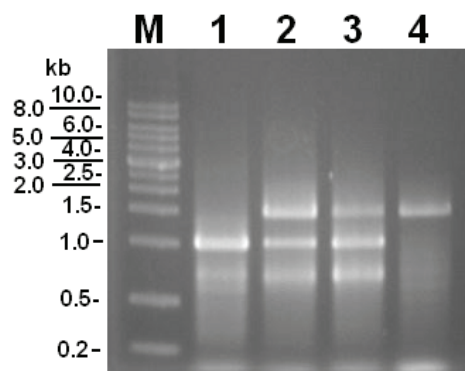


圖 5. 利用簡併式引子對 PRP5/Pot1 進行 RT-PCT，增幅 Lis1 分離株基因體 3' 端基因。Total RNA 分別純化自 Lis1 接種之 *N. benthamiana* (Lane 2 & 3) 與 PVMV Pep1 接種之 *C. annuum* (Lane 4)，分別得到分子量約 1.4 kb 之 RT-PCT 專一性產物。未接種之 *N. benthamiana* 之 total RNA 做為負對照 (Lane 1)，增幅約 1.0 kb 及 0.7 kb DNA 之非專一性產物；Lane M 為分子量標誌。

Fig 5. Electrophoresis analyses of RT-PCR amplified products of the 3' portion of isolate 'Lis1' viral genome. A product of 1.4 kb was amplified from total RNA prepared from 'Lis1' (Lane 2 & 3) infected *N. benthamiana* and PVMV Pep1 infected *C. annuum* (Lane 4) by RT-PCR with degenerate primers PRP5/Pot1. Total RNA of mock-inoculated *N. benthamiana* (Lane 1) was used as negative control. Lane M: molecular size markers.

表 2. 洋桔梗病毒分離株 Lis1 與 NCBI 之 GenBank 資料庫已發表之 PVMV 鞘蛋白基因序列比較

Table 2. Comparisons of the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein gene of lisianthus isolate 'Lis1' (Acc. No. FJ843065) with those of documented PVMV isolates in GenBank of NCBI

Accession No.	Country	Nucleotide identity (%)	Amino acid identity (%)
EU719647	Taiwan	99.3	99.3
EU719646	Taiwan	99.1	99.3
DQ645484	Korea	99.3	98.9
FJ617225	Taiwan	98.8	98.1
AJ780968	Ghana	92.8	97.4
AJ780966	Senegal	91.7	97.4
AJ780967	Cameroon	91.3	97.0
AJ780970	Ethiopia	84.3	91.4
AJ780969	Yemen	81.2	90.0
DQ854943 (ChiVMV)	Taiwan	76.4	78.0

比較 PVMV Lis1 分離株與 ChiVMV 鞘蛋白基因之核苷酸與胺基酸序列分別為 76.4% 相同度與 78.0% 相似度 (表 2)，但若進一步比較其胺基酸排列，二者在 N 端 DAG 序列之後有一段序列不同，這段區域 ChiVMV 有 42 個胺基酸，PVMV 只有 25 個胺基酸。其後約佔鞘蛋白 80% 區域的 237 個胺基酸相似度高達 92.8% (圖 6)。

討 論

本研究經由病毒的生物特性、血清學、鞘蛋白分子量及其基因序列分析，證明 2004 年自嘉義縣新港鄉所採集的洋桔梗病害標本之病毒

分離株 Lis1 是馬鈴薯 Y 病毒屬 (*Potyvirus*) 之一種 PVMV。PVMV 盛行於非洲、突尼西亞和近東地區，晚近才在遠東地區之韓國 (GenBank 資料) 和台灣 (Cheng *et al.* 2009) 發現。相較於辣椒葉脈斑駁病毒 (ChiVMV)，後者在台灣地區普遍危害茄科作物且與 PVMV 有血清關連性 (Moury *et al.* 2005; Tsai *et al.* 2008)。但 ChiVMV 寄主範圍限於藜科和茄科，PVMV 則寄主範圍較為廣泛，共可感染 13 科 46 種植物。洋桔梗屬於龍膽科，以往並無被 PVMV 感染的紀錄，本研究首次證實 PVMV 可以感染洋桔梗並影響其外觀及生長。

		1		50
ChiVMV	(1)	GESVDAGSVKGEDSSSKSADKQATEKKNKVSQQAQPSRQSEM		VPQVRD
PVMV-Lis	(1)	GETVDAG-----KSSGKEVTASK-----QP		TTSQPT EAKTVLD
Consensus	(1)	GESVDAG	KSA K T K	QP S E V D
		51		100
ChiVMV	(51)	RDVNVGTS	SGTFTIPRLKGI	IFSKLTIPKVKTKAVVNLEHLLDYAPDQIHLS
PVMV-Lis	(34)	RDVNA	GTQGTFTIPRLKGMSSRLTLPKVSSQSVVNLEHLLN	YKPDQVHLS
Consensus	(51)	RDVN GT	GTFTIPRLKGI	SKLTIPKV S AVVNLEHLL Y PDQIHLS
		101		150
ChiVMV	(101)	NTRALQSQFASWYE	GVKNDYDVTDEQM	QIILNGLMVWCIENGTSPNINGY
PVMV-Lis	(84)	NTRALQSQFASWY	NGVKNDYDVDDEQM	KIILNGLMVWCIENGTSPNINGM
Consensus	(101)	NTRALQSQFASWY	GVKNDYDV DEQM	IILNGLMVWCIENGTSPNING
		151		200
ChiVMV	(151)	WVMMDGDEQVEYPIKPLIDHAK	PSFRQIMAHFSNLAEAYIEKRNSEK	PYM
PVMV-Lis	(134)	WVMVDGEEQIEYPIKPLIDHAN	PSFRQIMAHFSNLAEAYIEKRNSEK	SYM
Consensus	(151)	WVMMDGDEQIEYPIKPLIDHA	PSFRQIMAHFSNLAEAYIEKRNSEK	YM
		201		250
ChiVMV	(201)	PRYGLQRNLTDMSLARYAFDL	YEMTSKTPVRAREAHIQMKAALR	GVSNR
PVMV-Lis	(184)	PRYGLQRNLTDMSLARYAFDF	YEMTSKTPVRAREAHIQMKAALR	NANNR
Consensus	(201)	PRYGLQRNLTDMSLARYAFD	YEMTSKTPVRAREAHIQMKAALR	NR
		251		286
ChiVMV	(251)	MFGLDGRVGTQEEDTERHTAEDVNRNMHNLLGVRGL		
PVMV-Lis	(234)	MFGLDGKVGVTQEEDTERHTAEDVNRNMHNLLGVRGV		
Consensus	(251)	MFGLDGVGTQEEDTERHTAEDVNRNMHNLLGVRGL		

圖 6. PVMV Lis1 與 ChiVMV 鞘蛋白胺基酸序列比對。

Fig. 6. Comparison of deduced amino acid sequences of PVMV 'Lis1' coat protein with ChiVMV.

利用西方漬染法分析結果，ChiVMV 條帶位置較 PVMV 高 (圖 4)，此結果符合定序分析鞘蛋白基因及其回推胺基酸序列之結果，ChiVMV 之鞘蛋白含 286 胺基酸，推測其分子量為 32.3 kDa，PVMV 之鞘蛋白含 270 胺基酸，推測其分子量為 30.3 kDa。且二者鞘蛋白除了在 N 端 DAG 序列之後有一段序列不同之外，其他約 80% 的胺基酸序列似度高達 92.8% (圖 6)，因此利用本試驗製備的多元抗體無法區分二者 (圖 3、4)，此結果與 Moury *et al.* (2005) 的結果一致。PVMV Lis1 分離株與 ChiVMV 雖然具有血清類緣關係，但因鞘蛋白基因之核苷酸與胺基酸序列相同度均低於 80%，仍為二不同病毒 (Tsai *et al.* 2008)。圖 3 之 ELISA 反應中，抗血清稀釋 100–100,000 倍時，Lis1 病毒分離株與 ChiVMV 抗血清之反應值均略高於 Lis1 抗血清，雖然實驗中都選用第 5 次採血所得到之抗血清，可能 ChiVMV 抗血清之力價高於 Lis1 抗血清，使其反應值均略高。

PVMV 在台灣已有感染甜椒、辣椒、蕃茄 (Cheng *et al.* 2009) 和龍葵 (Liao *et al.* 2009) 的紀錄，在接種試驗中，Lis1 分離株之寄主範圍及病原性都與甜椒分離株相同，田間不排除由茄科作物傳播至洋桔梗植株，花農應多注意田區周圍雜草管理及器具傳播，減少病毒傳播。

引用文獻 (Literature cited)

- Chang, C. A. and H. H. Lin. 1990. Isolation of *Bean yellow mosaic virus* from lisianthus developing foliar mosaic and flower breaking symptoms. *Plant Pathol. Bull.* 2:250–251.
- Chao, C. H., C. C. Chen, C. A. Chang, and C. C. Chen. 2000. Identification of a *Turnip mosaic virus* isolate causing systemic yellow spotting on lisianthus. *Plant Pathol. Bull.* 9:115–122.
- Chen, C. C., Y. K. Chen, and H. T. Hsu. 2000. Characterization of a virus infecting lisianthus. *Plant Dis.* 84:506–509.
- Chen, C. C. and H. T. Hsu. 2002. Occurrence of a severe strain of *Lisianthus necrosis virus* in imported carnation seedlings in Taiwan. *Plant Dis.* 86:444.
- Chen, C. C., H. T. Hsu, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2006. Serological and molecular properties of five potyviruses infecting calla lily. *Acta Hort.* 722: 259–269.
- Chen, C. C. and C. C. Hu. 1999. Purification and characterization of a cucumovirus from *Lisianthus rusellianus*. *Plant Prot. Bull.* 41:179–198.
- Chen, C. C., C. C. Hu, Y. K. Chen, and H. T. Hsu. 2002. A fabavirus inducing ringspot disease in lisianthus. *Acta Hort.* 568:51–57.
- Chen, C. C., S. L. Tsao, and H. T. Hsu. 2001. Diagnosis of *Lisianthus necrosis virus* infection by light and electron microscopy and serological assay. *Plant Pathol. Bull.* 10:105–114.
- Cheng, Y. H., C. C. Chen, and C. A. Chang. 2005. Whitefly-transmitted geminiviruses in ornamental plants and their control strategies in Taiwan. p.95–105. *in* the Proceedings of the international seminar on whitefly management and their control strategy. Food and Fertilizer Tech. Cent. and Agric. Res. Inst. Pub. Taichung, Taiwan, ROC.
- Cheng, Y. H., R. Y. Wang, C. C. Chen, C. A. Chang, and F. J. Jan. 2009. First report of *Pepper vein mottle virus* in tomato and pepper in Taiwan. *Plant Dis.* 93:107.
- Chu, F. H., C. H. Chao, M. H. Chung, C. C. Chen, and S. D. Yeh. 2001. Completion of the genome sequence of *Watermelon silver mottle virus* and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. *Phytopathology* 91:361–368.
- Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475–483.
- Cohen, J., A. Gera, R. Ecker, J. R. Ben, M. Perlman, M. Gokkes, O. Lachman, and Y. Antignus. 1995. Lisianthus leaf curl a new disease of lisianthus caused by *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Dis.* 79:416–420.
- Cohen, J., M. Lapidot, G. Loebenstein, and A. Gera. 2001. First report of *Sweet potato sunken vein virus* occurring in lisianthus. *Plant Dis.* 85:697.
- de Freitas, J. C., E. W. Kitajima, and J. A. M. Rezende. 1996. First report of *Tobacco streak virus* on lisianthus in Brazil. *Plant Dis.* 80:1080.

- Gera, A. G and J. Cohen. 1990. The natural occurrence of *Bean yellow mosaic*, *Cucumber mosaic* and *Tobacco mosaic viruses* in lisianthus in Israel. *Plant Pathol.* 39:561–564.
- Gonsalves, D. and M. Ishii. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 70:1027–1032.
- Iwaki, M., K. Hanaka, E. R. A. Maria, and S. Onogi. 1987. *Lisianthus necrosis virus*, a new necrovirus from *Eustoma russellianum*. *Phytopathology* 77:867–870.
- Jan, F. J., Y. X. Zheng, C. H. Chao, W. F. Ko, C. C. Chang, and C. C. Chen. 2003. Identification of a tobamovirus causing yellow mottle and stunting symptoms on lisianthus in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 12:122–132.
- Kritzman, A., H. Beckelman, S. Alexandrov, J. Cohen, M. Lampel, M. Zeidan, B. Raccach, and A. Gera. 2000. Lisianthus leaf necrosis: A new disease of lisianthus caused by *Iris yellow spot virus*. *Plant Dis.* 84:1185–1189.
- Liao, J. Y., T. C. Deng, and Y. H. Cheng. 2009. Pepper vein mottle virus isolated from black nightshade. *Plant Prot. Bull.* (in press)
- Lisa, V. and G. Dellavalle. 1987. Bean yellow mosaic virus in *Lisianthus russellianus*. *Plant Pathol.* 36:214–215.
- Lisa, V., A. M. Varia, M. d'Aquilio, G. Dellavalle, G. Masenga, R. G. Milne, and G. Bocardo. 1994. Characterization of an Ilarvirus from lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Acta Hort.* 377:81–89.
- Lisa, V., A. M. Varia, R. G. Milne, E. Luisoni, and S. Rapetti. 1990. *Tomato spotted wilt virus* in five crops on Liguria. *Inform. Fitopathol.* 40:34–41.
- McGovern, R. J., J. E. Polston, and B. K. Harbaugh. 1997. Detection of a severe isolate of *Impatiens necrotic spot virus* infecting lisianthus in Florida. *Plant Dis.* 81:1334.
- Moury, B., A. Palloix, C. Caranta, and P. Gognalons. 2005. Serological, molecular, and pathotype diversity of *Pepper vein mottle virus* and *Chilli vein mottle virus*. *Phytopathology* 95: 227–232.
- Provvidenti, R. 1985. Two newly recognized hosts of *Cucumber mosaic virus*: *Eustoma grandiflorum* and *Peristrophe angustifolia*. *Plant Dis.* 69:524.
- Tsai, W. S., Y. C. Huang, D. Y. Zhang, K. Reddy, S. H. Hidayat, W. Srithongchai, S. K. Green, and F. J. Jan. 2008. Molecular characterization of the CP gene and 3'UTR of *Chilli vein mottle virus* from South and Southeast Asia. *Plant Pathol.* 57: 408–416.
- Wolcan, S., L. Ronco, E. D. Bo, G. Lori, and H. Alippi. 1996. First report of diseases on lisianthus in Argentina. *Plant Dis.* 80:223.

Isolation and Identification of *Pepper Veinal Mottle Virus* on Lisianthus¹

Ying-Huey Cheng^{2,4}, Chin-Chih Chen², Jye-Yann Liao², Ting-Chin Deng², and
Chin-An Chang³

Abstract

Cheng, Y. H., C. C. Chen, J. Y. Liao, T. C. Deng, and C. A. Chang. 2009. Isolation and identification of *Pepper veinal mottle virus* on lisianthus. *J. Taiwan Agric. Res.* 58:196–207.

Lisianthus plants exhibited stunting and yellow spots were collected from Chiayi county in 2004. Virus isolates were obtained through 3 successive single lesion passages on *Chenopodium quinoa* and then propagated on *Nicotiana benthamiana*. The virus isolate caused mild mottle symptoms on bell pepper plants and faint yellow spots on lisianthus leaves. Virus particles were purified from infected *N. benthamiana* by polyethylene glycol precipitation and then followed by Cs₂SO₄ isopycnic centrifugation. Relative molecular weight of the coat protein of the virus was 31 kDa when analysis by SDS-PAGE. Antiserum has been produced by immunizing rabbit with virus particles. Indirect ELISA and Western blotting analyses indicated that the lisianthus virus was serologically related to *Chilli veinal mottle virus* but not to *Potato virus Y* and *Turnip mosaic virus*. Using the potyvirus degenerate primers, a 1.4 kb DNA fragment was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequence data of the amplified fragment revealed that the causal virus was an isolate of *Pepper veinal mottle virus* as it shared 99.3% identities to the nucleotide sequence of coat protein (CP) gene of PVMV (EU719467). This is the first report of PVMV infection on lisianthus.

Key words: Lisianthus, *Pepper veinal mottle virus*.

-
1. Contribution No.2366 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: August 10, 2009.
 2. Respectively, Associate Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Professor, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: yhcheng@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.