

台灣感染萵苣之 *Bidens mottle virus*：病毒鑑定 及全長度基因體解序分析¹

陳金枝^{2,3} 鄧汀欽² 黃春惠² 林碧雲² 廖吉彥²

摘 要

陳金枝、鄧汀欽、黃春惠、林碧雲、廖吉彥。2012。台灣感染萵苣之 *Bidens mottle virus*：病毒鑑定及全長度基因體解序分析。台灣農業研究 61:209–221。

從田間栽培萵苣之葉片呈現黃化嵌紋病徵組織，獲得一個病毒分離株，命名為 WF，其與 *Potyvirus* 專一性單株抗體產生正反應，並與 *Potyvirus* 屬病毒之簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 可得到一預期之 1.3 kb DNA 片段，RT-PCR 產物經選殖及定序後，證實其鞘蛋白胺基酸序列與 *Bidens mottle virus* (BiMoV) 向日葵分離株 (SF-1, GenBank Accession number NC_014325) 相同度最高，達 99.3%。以 WF 分離株之純化病毒顆粒所製備完成之多元抗血清 (As 161)，與萵苣分離株 WF 及由美國 ATCC 購得之 BiMoV 標準對照株，於 SDS-免疫擴散反應中均產生免疫沈澱反應，且彼此之沈澱帶互相融合呈現同源反應。由分子生物學及血清學之證據顯示萵苣 WF 分離株屬於 BiMoV 病毒。本研究亦由花蓮栽培之萵苣獲得一病毒分離株 HL 及咸豐草上分離得三個病毒分離株 B3、B4、及 B12，此等分離株與 WF 抗血清反應後均與 WF 分離株產生血清同源反應，其大蛋白 (polyprotein) 胺基酸序列均與 BiMoV 病毒之相同度達 97% 以上，顯示在台灣之萵苣及咸豐草已受到 BiMoV 之感染。本研究針對 BiMoV-WF、HL、B3、B4、及 B12 等病毒分離株均已完成其全長度基因體之核苷酸定序，登錄於 GenBank 取得登錄序號分別為 EU250213、EU250214、EU250212、EU250211、及 EU25021。由病毒全長度鞘蛋白胺基酸序列分析分離株間的類緣關係，結果顯示萵苣分離株與咸豐草分離株個別形成分群現象，而向日葵分離株與萵苣分離株類緣關係較相近。本研究為 BiMoV 的萵苣及咸豐草分離株基因體全長度定序及其分子特性之首次報告。

關鍵詞：咸豐草斑紋病毒、萵苣、全長度基因體。

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2681 號。接受日期：101 年 6 月 18 日。
 2. 本所植物病理組助理研究員、研究員、研究助理、研究助理、助理研究員。台灣 台中市。
 3. 通訊作者，電子郵件：chinzue@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302803。

前 言

Bidens mottle virus (BiMoV) 為 *Potyvirus* 屬病毒，病毒粒子呈長絲狀 (長度約 720–750 nm)，可藉由蚜蟲或汁液機械傳播病毒，目前尚未有種子傳毒之證據 (Edwardson & Zettler 1968; Purcifull *et al.* 1971)。BiMoV 最早乃由 Christie *et al.* (1968) 於美國佛羅里達地區之咸豐草上分離出來，隨後被發現廣泛發生於佛羅里達州並成為影響該州南部蔬菜栽培的重要病毒病害 (Orsenigo & Zitter 1971)。此病毒之寄主範圍廣泛 (Purcifull *et al.* 1971; Zurawski *et al.* 1980)，涵蓋有萵苣 (Purcifull *et al.* 1971; Purcifull & Zitter 1971; Zitter 1976)、菊苣 (Zitter 1976)、蠶豆 (Baker *et al.* 2001)、扁豆 (*Lupinus angustifolius*) (Edwardson *et al.* 1976)、網紋草 (*Fittonia versaffeltii*) (Zurawski *et al.* 1980)、百日草 (*Zinnia elegans*) (Maritan *et al.* 2004)、金盞花 (*Calendula* spp.) (Huang & Jan 2011)、黃翠菊 (Wisler 1984) 與霍香薊 (Logan *et al.* 1984) 等花壇植物及數種雜草植物如北美獨行菜 (*Lepidium virginicum*) (Christie *et al.* 1968)、薊罌粟 (*Argemone mexicana*) 和熱帶刺茄 (*Solanum viarum*) (Baker *et al.* 2007)、薔絲花 (*Ammi majus*) (Baker *et al.* 2008)；台灣於向日葵上亦發現有此病毒之感染 (Liao *et al.* 2001, 2009)，2008 年筆者等人初步由萵苣及咸豐草分離出 BiMoV 之病毒分離株，證實此病毒在此等作物上之發生 (Chen *et al.* 2008)。

BiMoV 感染萵苣後造成植株葉片嵌紋、斑紋或矮化等病徵 (Purcifull & Zitter 1973)。目前明確有報導發生 BiMoV 病毒之地區包括美國 (Baker *et al.* 2001)、台灣 (Chen *et al.* 2008; Liao *et al.* 2009; Huang & Jan 2011) 及巴西 (Maritan *et al.* 2004) 等地。目前為止 BiMoV 病毒之核酸分子序列資料僅有發生於熱帶刺茄 (*Solanum viarum*) (Baker *et al.* 2007)、金盞

花 (Huang & Jan 2011)、薔絲花 (Youssef *et al.* 2007) 等病毒分離株之鞘蛋白或部分核酸片段序列，而全長度核酸序列僅有向日葵分離株被發表 (Liao *et al.* 2009)。Liao *et al.* (2001) 由向日葵分離之一種 *Potyvirus* 病毒分離株 (SF-1)，依據血清學特性及鞘蛋白基因序列比對分析結果，命名為向日葵黃化斑點病毒 (Sunflower chlorotic spot virus, SCSV)，後經進一步定序其全長度基因體，並與美國 ATCC 保存之 BiMoV 標準病毒株 (American Type Culture Collection, ATCC PV-165 isolate) 進行血清特性比對，證實該 SCSV-SF-1 實際為 BiMoV 的一個系統 (Liao *et al.* 2009)，但當時 ATCC PV-165 isolate 病毒鞘蛋白核酸尚未被定序，向日葵分離株 (SCSV-SF-1) 是 BiMoV 全長度基因體首度完成定序之記錄。

BiMoV 病毒於萵苣上發生及其對萵苣的影響早有報告 (Purcifull *et al.* 1971; Purcifull & Zitter 1971; Zitter 1976)，然至今尚缺乏病毒之全長度基因體序列以及其分子特性。本研究首次經由與 ATCC 保存之 BiMoV 標準病毒進行血清親緣關係比對，證實台灣栽培之萵苣有此病毒之發生，且進一步由萵苣及咸豐草等寄主所分離出之病毒分離株，完成其全長度基因體之選殖與定序，進而以其鞘蛋白基因序列之相同度進行比對以釐清 BiMoV 分離株間之分類地位。本研究亦由萵苣分離株所製備之病毒抗血清應用於血清檢測，作為生態調查與病毒檢定之需，得以掌握此病毒在台灣發生之概況。

材料與方法

病毒來源與保存

由霧峰地區田間栽培之萵苣植株，選取葉片呈現黃化嵌紋病徵之葉片組織，並與市售 *Potyvirus* 專一性單株抗體 (Agdia Inc. Elkhart, USA) 於 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 反應為正反應者，取其葉片浸漬於 50%

甘油中，於 -20°C 下保存，供後續實驗所需。切取葉片病組織以磷酸鉀緩衝液 (0.05 M, pH 7.5) 研磨均質後，接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片，並進行連續 3 次單斑之分離接種，以獲得單斑純化之分離株 (代號 WF)，以此分離株進行各項病毒鑑定之試驗材料來源。

本研究另由美國 ATCC (American Type Culture Collection) 購得 BiMoV 標準病毒株 (BiMoV-PV165)、花蓮採集萵苣獲得之 HL 分離株、以及田間咸豐草上分離得 3 個病毒分離株 (B3、B4 及 B12)，作為 BiMoV 病毒鑑定及不同分離株特性之比較試驗。

寄主接種試驗

將繁殖於奎藜上之單斑病組織，以磷酸鉀緩衝液 (0.05 M, pH 7.5) 研磨均質後分別接種於紅藜 (*C. amaranticolor* Coste and Reyn)、咸豐草 (*Bidens pilosa*)、菸草 (*Nicotiana benthamiana* Domin)、向日葵 (*Helianthus annuus*)、及不同品種之萵苣 (*Lactuca sativa* L.) 如葉萵苣、球莖萵苣、尖葉萵苣、結球萵苣等。接種後之植株放置於溫室觀察病徵表現，接種後 14 天摘取葉片組織進行 ELISA 檢測。

另以 BiMoV-PV165 於農試所種原室之檢疫隔離溫室中進行上述之各項接種試驗，以比較病原性差異。試驗中使用之各項器物、土壤盆鉢及植體殘留物等於試驗後均予以收集，以高壓滅菌釜銷毀之。

病毒純化及多元抗體製備

取 WF 萵苣分離株接種於菸草 (*N. benthamiana*)，採集菸草罹病組織 100 g 及磷酸萃取液 (0.5 M potassium phosphate、1% β -Mercaptoethanol、0.01 M EDTA, pH 7.5；使用前加入 0.25% Na_2SO_3) 以 1:2 (w/v) 之比例混合，以高速粉碎機均質之以進行病毒純化，相關純化步驟參照以往之研究 (Chen & Chang 1998)，最終以硫酸銨 (Cesium sulfate) 梯度離

心法，吸取蛋白帶並濃縮病毒顆粒，病毒產量以波長 260 nm 之吸收值 (HITACH spectrophotometer 220S, HITACH, Ltd., Tokyo, Japan) 和 *Potyvirus* 之係數 2.4 (extinction coefficient) (Holling & Brunt 1981, Potyvirus Group. CMI/AAB Descriptions of Plant Virus, No. 245, <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=245>) 作估算，病毒之蛋白質分子量以 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳分析之 (Laemmli 1970; Chen & Chang 1998)。

以純化所得之病毒顆粒 (1 mg/mL) 懸浮液經輔助劑乳化後，進行每週 1 次，連續 4 週之紐西蘭兔免疫注射，每次注射 1 mg 之純化病毒液，第五週起由兔耳朵進行靜脈採血，以製備多元抗體。

抗血清免疫檢測分析

酵素連結免疫吸附反應 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)：本試驗參照以往研究進行之 (Chang *et al.* 1988; Chen *et al.* 2010)，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 96 孔 EIA 反應盤內，每樣品加 2 孔 (100 μL /well) 為 2 個重複，置於 37°C 定溫 3–4 小時進行覆膜反應 (coating reaction)，然後以 $1\times$ PBST 緩衝液沖洗 3 次；其次分別加入欲檢定之病毒抗體後，放置在 25°C 定溫箱反應 2–3 小時；爾後以 $1\times$ PBST 緩衝液沖洗 3 次，再加入已稀釋 6000 倍之山羊抗兔二次抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA) (100 μL /孔)，置於 25°C 之定溫箱反應 2–3 小時；最後再以 $1\times$ 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 (p-NPP) (Amresco, Solon Ind., Ohio, USA) 進行呈色反應。反應 30 分鐘後，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。樣品吸光值大於 2 倍之健康葉片吸光值者，視為正反應。

SDS-免疫擴散反應 (Sodium Dodecyl Sulfate-immunodiffusion test)：將 BiMoV 感染的罹病組織研磨汁液及純化所得之鞘蛋白，分別與一次水及 3% SDS 以等體積比例混合 (1 : 1 : 1) 後，取其濾液於沸水中悶 3 分鐘，作為 SDS 處理過之抗原，再與自製之 #161 全血清進行 SDS-免疫擴散反應 (Purcifull & Batchelor 1977)，以觀察抗體與抗原間白色沈澱帶的血緣關係。

西方轉漬法 (western blotting)：取 0.1 g 之罹病葉組織，於液態氮中研磨均質後，加入 200 μ L 之樣品處理液 (240 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 4% β -Mercaptoethanol)，取 100 μ L 研磨液加入等體積之 LDS 溶液 (Laemmli 1970) 混勻後，以沸水悶 3 分鐘。處理後之樣品經 SDS-PAGE 電泳後，取膠體將其轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，之後分別以欲檢測之病毒抗體進行血清反應。

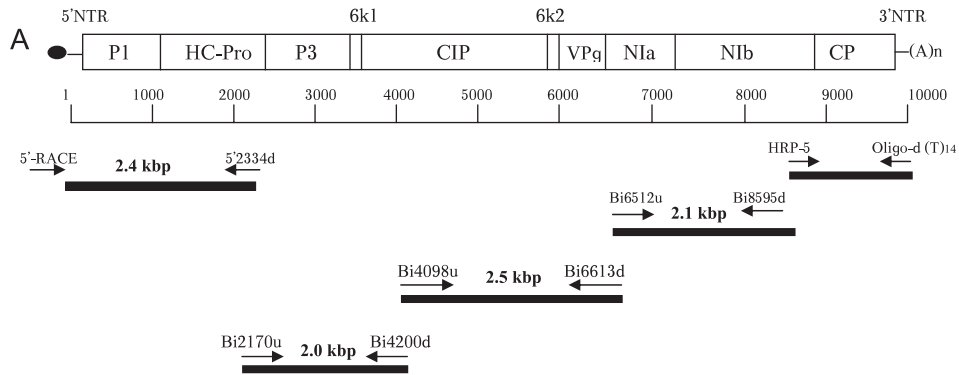
病毒鞘蛋白核酸序列之選殖與定序分析

反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)：秤取 0.1 g 之罹病葉片組織，利用植物全量核酸純化試劑組 (RNeasy Plant Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany) 進行 RNA 核酸之純化。以此純化所得之全量 RNA 為模版，利用 *Potyvirus* 簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ (5'ATGATHGARKCNTGGGG/5'GCGGCCGCTTTT TTTTTTTTTT) (Pappu *et al.* 1998; Chen *et al.* 2006) 進行 RT-PCR。依據單步驟 RT-PCR 試劑組 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA) 之配方，於每 50 μ L 反應液中分別加入 2 μ L 全量 RNA、25 μ L reaction buffer、18 μ L Rnase free water、1 U Reverse transcription polymerase、及各 2 μ L 之 20 μ M HRP-5 和 Oligo-dT₍₁₄₎ 引子，於熱循

環反應儀 (GeneAmp PCR system 9700, applied biosystems Co., Foster, CA) 中，設定反應程序為 50°C 下進行反轉錄 30 分鐘，94°C 變性 2 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 1 分鐘半，50°C 下煉合 1 分鐘，72°C 下聚合 2 分鐘，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6 分鐘。此一反應預估可增幅出包含鞘蛋白大小約 1.3 kbp 之核酸產物，反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME USA) 進行分析。

鞘蛋白核酸片段選殖和核苷酸序列分析：將 RT-PCR 增幅所得之 1.3 kbp DNA 片段選殖於 TOPO TA-PCR II 載體上 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)，經篩選出含有 1.3 kbp DNA 之嵌入序列 (insert sequence) 選殖株送交明欣生物技術有限公司，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列，所得之序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc. Wesconsin, USA) 分析軟體進行分析，並與 GenBank 上已登錄之病毒核酸序列進行鞘蛋白基因序列之比對。

病毒全長度基因選殖及解序：以各分離株之白藜病斑組織所抽取之全量核酸為 RNA 來源，並以 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ 引子對所增幅出之病毒 3' 端 1.3 kbp 核酸之已知序列為基礎，依據其鞘蛋白核酸序列初步鑑定其和 BiMoV-SF1 (NC_014325) 分離株為相同病毒之不同系統，乃以 BiMoV-SF1 全度基因體為參考基礎，繼續往病毒基因 5' 端設計引子對，進行病毒全長度核酸序列之選殖與定序 (圖 1A)。所設計使用之引子對包括 Bi6512u/Bi8595d (5'TGCCTAAGGACTTCCC/5'TTATTCTCAGGAGGAGGAATTT)、Bi4098u/Bi6613d (5'ATATTTTTGCAAACAATAGTGACCA/5'TGAGATTGATTTATTCTGGAAGTTT)、Bi2170u/Bi4200d (5'AATCTTCTACCCAGATGTTTCATGA/5'AAGTTGGATGGTAGACGGATA) (圖 1B)。病毒 5' 終端 (5' end) 約 2.4 kb 之核酸



A 5'-RACE: the 5'-RACE abridged anchor primer (Gibco BRL)

- B**
- 5'2334d: 5'AGTGT TTTATGTCTGATTCCA
 - Bi2170u: 5'AATCTTCTACCCAGATGTTTCATGA
 - Bi4200d: 5'AAGTTGGATGGTAGACGGATA
 - Bi4098u: 5'ATTATTTGCAAACAATAGTGACCA
 - Bi6613d: TGAGATTGATTTATTCTGGAAGTTT
 - Bi6512u: 5'TGCCTAAGGACTTCCC
 - Bi8595d: 5'TTATTCTC AGGAGGAGG AATTT
 - HRP-5: 5'ATG ATHGARKCNTGGGG
 - Oligo-d (T)₁₄: 5'- GCGGCCGC(T)₁₄

圖 1. *Bidens mottle virus* (BiMoV) 全長度基因體之增幅與構築策略。

Fig. 1. The strategy for determination of the complete nucleotide sequences of the RNA genomes of *Bidens mottle virus* (BiMoV). (A) Schematic representation of the genetic structure of BiMoV and the overlapped cDNA fragments amplified from reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) by the primer pairs. Black bars represent length of amplified DNA fragments; (B) Sequences of the primers used in RT-PCR.

片段，則由已選殖定序出之病毒核酸序列設計 2 組引子 5'2395d (5'AAGTCAGACAGATTGTCTGCA) 及 5'2334d (5'AGTGT TTTATGTCTGATTCCA)，並以純化病毒之核酸為模版，以 5'RACE 試劑組 (5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends, Invitrogen Co. Carlsbad, CA)，進行 5' 終端之核酸序列增幅與選殖，反應程序依試劑組之建議方式進行。

病毒分離株之類緣關係分析：將本研究所得之不同病毒分離株，包括 2 個萵苣分離株 (WF、HL)，3 個咸豐草分離株 (B3、B4、B12)，向日葵分離株 SF-1 (NC_014325)，以及購自 ATCC 之 BiMoV 標準病毒 (BiMoV-PV165)，以其全長度基因體所對應之大蛋白 (polyprotein) 胺基酸序列進行類緣關係分析

(phylogenetic analysis)，分析方法依據 Tomimura *et al.* (2003) 等學者所發表的方法進行。所有序列先以 CLUSTAL X version 1.8 (Thompson *et al.* 1997) 彙整分析後，再利用 PAUP 4.0 程式 (Swofford 1998) 進行 NJ (The neighbor-joining) 結合 BRM 法 (The bootstrap resampling method) (Felsenstein 1985; Thompson *et al.* 1997) 作分析。其中 bootstrap values 乃由逢機重複 1000 次的取樣所計算之結果，所得之類緣演化樹以 Tree view (Page 1996) 程式顯示。

結 果

接種試驗結果

將罹病萵苣葉片 (圖 2A) 組織液，接種於奎藜後約 7-10 天左右於葉片上形成局部病

斑，14 天後則於新生葉片出現系統性的褪色病斑 (圖 2C)；紅藜上則於接種後 3–5 天左右即可見局部病斑形成，亦有系統性病斑產生。以奎黎葉片為接種源，接種於栽培種萵苣 (圖 2B)、菸草 (圖 2D)、向日葵 (圖 2E) 等植株，均有黃化嵌紋之病徵形成，利用 *Potyvirus* 專一性抗體以 ELISA 檢測罹病葉片也獲得正反應結果。BiMoV-PV165 的接種試驗結果與萵苣分離株者類似，但其病徵發展較緩，於奎黎及紅藜上於接種後 14 天左右有病斑形成，20 天左右產生有系統性病斑 (結果未出示)。本研究另由咸豐草上所得之病毒分離株 (圖 2F)，其接種結果和萵苣分離株相同。

萵苣分離株純化、抗血清製備及血清特性分析

純化之萵苣病毒分離株，其 260 nm/280 nm 之比率約為 1.2，符合 *Potyvirus* 屬病毒 260/280 為 1.24 之範圍與特性 (Stace-Smith & Tremaine 1970)，由 SDS-PAGE 所估算之鞘蛋白分子量約 30 kDa (結果未出示)。此蛋白與經兔免疫注射後所製備之 As 161 抗血清在 ELISA 試驗中呈現正反應。於 SDS-免疫擴散反應中，萵苣分離株全血清 (As 161) 與 BiMoV-PV165、萵苣分離株 WF、向日葵 SF-1 分離株及咸豐草分離株等罹病組織抗原均可與產生明顯之白色沉澱帶，且沉澱帶間相互融合 (圖 3)，顯示此等病毒分離株在血清學上具同源性。

西方轉漬法之結果顯示 As 161，對於 BiMoV-向日葵、萵苣、咸豐草及 BiMoV-PV165 等分離株感染之罹病組織中均可檢出 BiMoV 病毒鞘蛋白相對應之分子量 (30 kDa) (圖 4)。

WF 分離株鞘蛋白核酸序列分析及 BiMoV 分離株基因體全長度分析

由萵苣分離株 WF，萃取其全量核酸並以 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ 引子對經 RT-PCR 反應後，於電泳分析中均可獲得一預估值約 1.3 kbp 左右之核酸片段，此等核酸片段經選殖及定序分

析結果顯示，其對應鞘蛋白之胺基酸序列與感染向日葵之 *Bidens mottle virus* SF-1 (GenBank Accession No. NC_014325) 相同度最高 (表 1)，達 99% 以上，進而乃依據 BiMoV SF-1 之全長度基因體做為參考進行不同 BiMoV 分離株之基因體定序。

萵苣及咸豐草之 BiMoV 分離株，進行其全長度基因體之選殖與定序 (圖 1)，分別從不同來源之萵苣分離得 2 個選殖株，包括 WF 及 HL，登錄於 GenBank 上，其登錄序號分別為 EU250213 及 EU250214；由咸豐草上分離得 3 個選殖株，包括 B3、B4、B12，其登錄序號分別為 EU250210、EU250211 及 EU250212 (表 1)。所解得之不同分離株基因體序列，具有相同之基因體結構，包含有 9703 核苷酸 (不包括 3' 端之 poly A)，病毒 5' 端及 3' 端之非轉譯區。其中 5' 端之核苷酸序列包含 3 個 A (adenine)，蛋白轉譯起始位置為位於核苷酸 (nucleotide, nt) 134–136 之 AUG triplet；對應一個含有 3071 個氨基酸之大蛋白轉譯架構 (open reading frame)；不同分離株與 GenBank 上已登陸之 BiMoV-SF-1 (Acc. No. NC_014325) 全長度基因體序列之相同度分析結果顯示，對應全長度大蛋白及鞘蛋白之核苷酸與氨基酸相同度均高於 97% 以上。對應鞘蛋白氨基酸有 268 個，其起始位置第 8–10 個氨基酸為 DAG triplet，乃 *Potyvirus* 屬病毒可被蚜蟲傳播之分子證據 (Atreya *et al.* 1991)。

依據 BiMoV-SF-1 (Liao *et al.* 2009) 以及 *Potyvirus* 屬病毒氨基酸序列特性 (Ward *et al.* 1992) 歸納本研究所得之不同 BiMoV 分離株之基因體對應之蛋白分解酶辨識位址 (Protease recognition site)，均有一致性，分別是：P1protease 為 MTHF/S、HC-Pro protease 為 YRVG/G、N1a protease 於 P3/6k1、6k1/CIP 及 CIP/6k2 之辨識位址分別為 VSHQ/G、VRHQ/S 及 VHHQ/S，於 6k2/VPg、VPg/N1a、N1a/

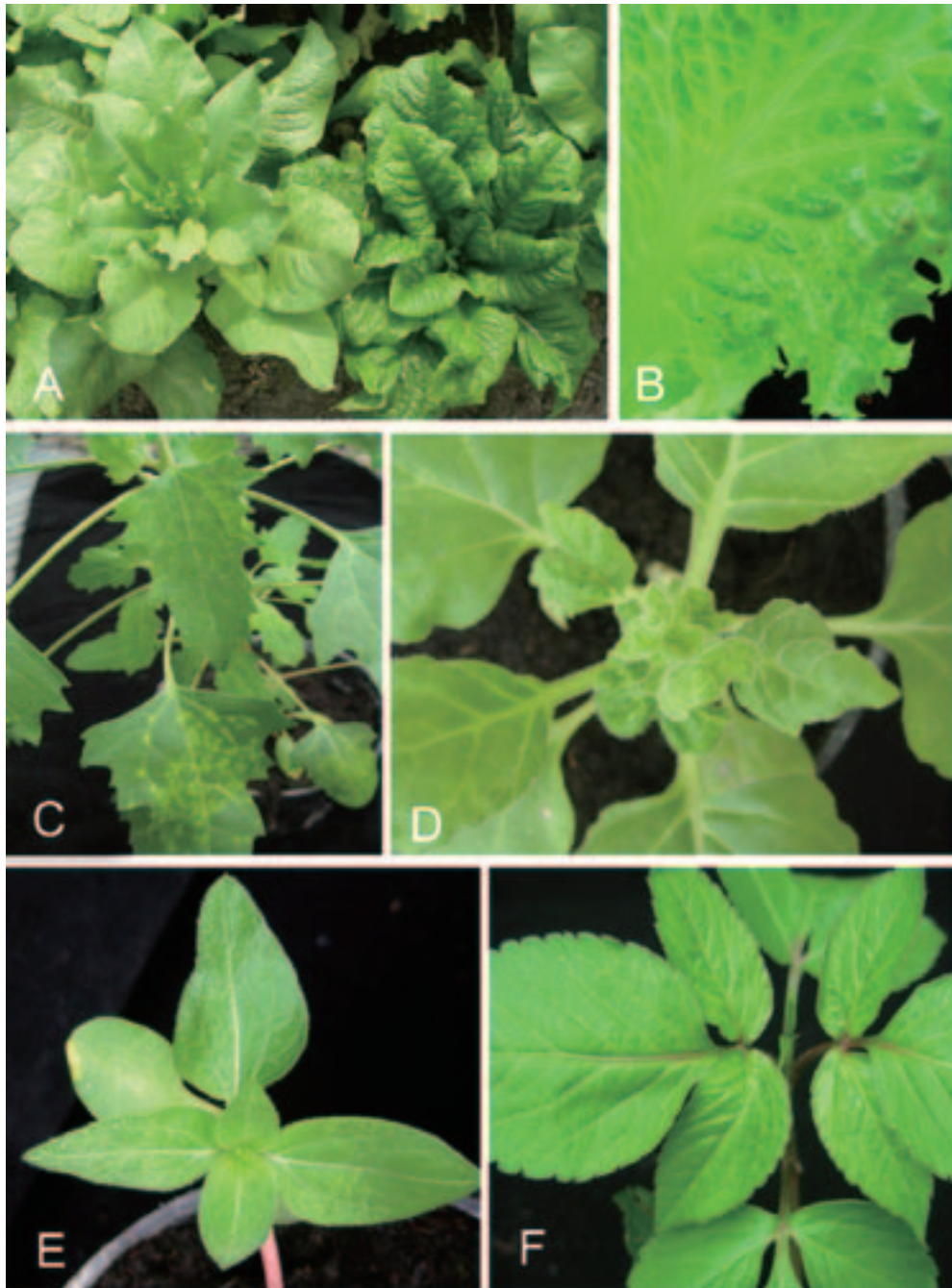


圖 2. *Bidens mottle virus* (BiMoV) 感染田間萵苣之病徵 (A)，及萵苣分離株 (BiMoV-WF) 接種萵苣 (B)、奎藜 (*Chenopodium quinoa*) (C)、菸草 (*Nicotiana benthamiana*) (D)、向日葵 (E) 及咸豐草 (F) 所引起之病徵。

Fig. 2. Symptoms of *Bidens mottle virus* (BiMoV) naturally infecting lettuce plants (A) and that caused by mechanical inoculation of BiMoV-WF on lettuce (B), *C. quinoa* (C), *N. benthamiana* (D), sunflower (E), and bidens (F).



圖 3. 對應 BiMoV-WF 分離株之多元抗體於 SDS 免疫擴散法中與不同分離株抗原之反應。

Fig. 3. The antiserum against BiMoV-WF reacted with various isolates of BiMoV in sodium dodecyl sulfate (SDS)-immunodiffusion test. The central well was filled with antiserum against purified virion of BiMoV-WF (As 161). The peripheral wells were filled with SDS-treated antigens including B4 (bidens isolate), PV165 (ATCC typical isolate of BiMoV), SF1 (sunflower isolate), WF (lettuce isolate), and H (healthy lettuce control), respectively.

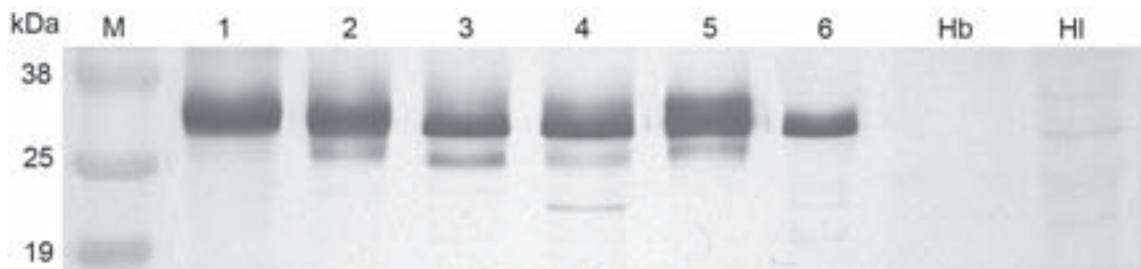


圖 4. 對應 BiMoV-WF 分離株之多元抗體於西方轉漬法中檢測不同分離株之結果。

Fig. 4. Results of the antiserum against BiMoV-WF reacted with various isolates of BiMoV in western blot for detecting BiMoV in infected plant tissues. Lane M, protein marker; lane 1, BiMoV-SF-1-infected leaf tissue of *Chaenopodium quinoa*; lane 2, BiMoV-WF-infected lettuce tissue; lane 3, BiMoV-HL-infected lettuce tissue; lane 4, BiMoV-B4-infected bidens tissue; lane 5, ATCC typical isolate of BiMoV-PV-165 infected *Nicotiana benthamianum* tissue; lane 6, BiMoV-PV-165-infected *C. quinoa* tissue; lane Hb and HI, the healthy tissues of bidens and lettuce, respectively. Samples were reacted with the 1000 \times -diluted antiserum to BiMoV WF isolate (As 161).

Nib 及 Nib/CP 之辨識位址分別為 VRHQ/G、ASHE/S、VREQ/G 及 VHHQ/A。

由本研所得之 BiMoV 萵苣及咸豐草分離株，以其全長度大蛋白之氨基酸序列與 BiMoV-SF-1 進行類緣關係分析，由其樹狀圖可發現依照寄主來源不同，來自萵苣之分離株，以及來自咸豐草之分離株個別形成分群現象，而向日葵分離株與萵苣分離株類緣關係較相近 (圖 5)。

討 論

萵苣 (*Lactuca sativa* L.) 為菊科草本葉菜，為全球普遍栽培具經濟重要性之蔬菜 (Pavan *et al.* 2008)，目前田間或實驗室植物至少有 20 餘種病毒可感染萵苣 (Chen *et al.* 1995a)。本研究由病毒純化、接種試驗、血清特性以及病毒全長度基因體之特性分析，並經由美國 ATCC 所購得咸豐草斑紋病毒標準病毒樣品 (BiMoV-PV-165) 所進行之血清特性鑑定結果顯示，萵苣及咸豐草病毒分離株與 BiMoV-PV-165 是相同病毒的不同系統，也顯示台灣栽培之萵苣已受此病毒之感染，引起黃化嵌紋病徵，嚴重時並引起植株矮化等生育不良之徵狀 (圖 2A)。除了 BiMoV，台灣有紀錄之萵苣病毒包括萵苣嵌紋

表 1. 不同 *Bidens mottle virus* 分離株之基因體序列相同度比較

Table 1. Comparative identities of genomic sequences of various isolates of *Bidens mottle virus*

| Virus isolates | % identity | | | |
|-------------------------------|-----------------|------|--------------|------|
| | Polyprotein | | Coat protein | |
| | nt | aa | nt | aa |
| NC_014325 (SF-1) ^z | 100 | 100 | 100 | 100 |
| EU250213 (WF) ^z | 98.0 | 98.4 | 98.1 | 99.3 |
| EU250214 (HL) ^z | 98.0 | 98.4 | 98.3 | 99.3 |
| EU250212 (B3) ^z | 97.0 | 97.9 | 98.4 | 98.1 |
| EU250211. (B4) ^z | 98.0 | 98.3 | 98.3 | 98.9 |
| EU250210 (B12) ^z | 98.0 | 98.5 | 98.3 | 98.9 |
| HQ117871 (TwCal) | NA ^x | NA | 98.3 | 98.9 |
| PVY-EF026074 ^y | 63.8 | 62.4 | 74.0 | 69.4 |
| SuCMoV-AF255677 ^y | NA | NA | 71.0 | 69.2 |
| SuCMoV-AY344048 ^y | NA | NA | 73.0 | 69.7 |
| BiMV-AY960150 ^y | NA | NA | 73.1 | 68.8 |
| BiMV-AY960151 ^y | NA | NA | 72.5 | 68.9 |

^z BiMoV isolates collected in Taiwan, NC_014325 is sunflower isolate, EU250210, EU25011, EU250212 are bidens isolates, EU250213 and EU250214 are lettuce isolates.

^y PVY, *Potato virus Y*; SuCMoV, *Sunflower chlorotic mottle virus* (Dujovny *et al.* 2000); BiMV, *Bidens mosaic virus* (Inoue-Nagata *et al.* 2006).

^x NA, No analyzed.

病毒 (*Lettuce mosaic virus*) (Chen *et al.* 1995b) 及萵苣捲葉嵌紋病毒 (*Lettuce leafroll mosaic caulimovirus-like*) (Chen & Chen 1994) 未知之球形病毒 (Chen *et al.* 1995a)。

BiMoV 寄主範圍廣泛，雜草中如咸豐草為其寄主之一 (Purcifull & Zittler 1971, 1973)，寄主接種試驗中顯示分離自萵苣、向日葵及咸豐草之 BiMoV 分離株，在不同寄主間均有感染性。而咸豐草廣泛分佈於田野各處，本研究結果中顯示分離自咸豐草之 BiMoV 分離株可感染萵苣造成病徵，顯見 BiMoV 存在田間咸豐草上對於作物栽培的感染風險。記錄上本病毒能透過蚜蟲傳播 (Zittler 1976)，由本研究之鞘蛋白核酸分子結果顯示 BiMoV 具有與蚜蟲傳播關聯的 DAG triplet 得到印證，因此在防除 BiMoV 感染萵苣的策略上，蚜蟲及雜草的防除均是重要關鍵之一。唯田間媒介蚜蟲與雜草中間寄主種類之鑑定，值得後續進一步研

究，而本研究所揭示的血清學及分子生物學診斷方法洽可應用在後續之研究。

BiMoV 其病毒分子與血清特性早於 1968 年即被鑑定與確認，以及此病毒在田間之殘存、雜草寄主、與對萵苣栽培之影響均有明確的記載重要性 (Orsenigo & Zitter 1971; Purcifull & Zittler 1971)。繼 Liao *et al.* (2009) BiMoV 向日葵分離株之後，首度完成 BiMoV 萵苣與咸豐草分離株之病毒全長度基因體之定序，根據病毒全長度基因體定序分析結果顯示，由向日葵、萵苣與咸豐草所得之病毒分離株，其基因體結構與特性相類似，5' 終端及基因體表現之病毒蛋白酶切位 (Protease cleavage site) 均相同，並由基因體資料得以進一步釐清 BiMoV 不同分離株間之類緣差異性，其差異性因寄主來源不同而分群，來自萵苣之分離株，以及來自咸豐草之分離株個別形成分群現象 (圖 5)。自然界同時可感染咸豐草及萵苣之病毒尚有咸

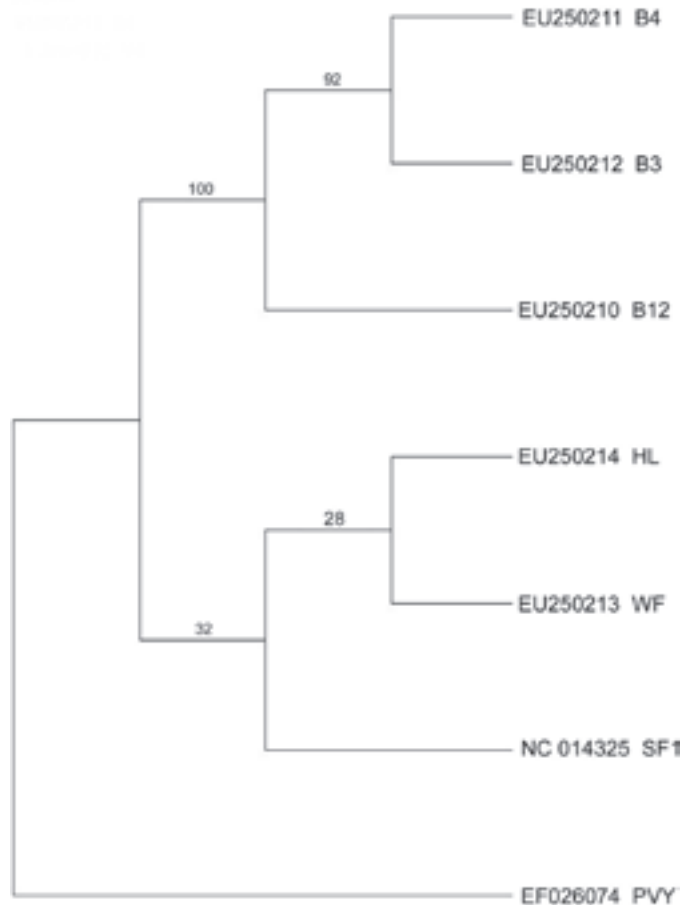


圖 5. 六個 BiMoV 分離株基因體全長度類緣關係之分析。

Fig. 5. A phylogram derived from the analysis of genetic distances based on the amino acid sequences of complete polyprotein of six isolates of BiMoV. The tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) algorithm with the bootstrap re-sampling method (1000 random re-samplings), and analysis by PAUP 4.0. Numbers at each node indicate the percentages of bootstrap samples. Horizontal branch length is drawn according to the scale bar indicating 1 substitution per 100 amino acid positions. PVY (EF026074), a *Potato virus Y* genome, was used as an outgroup element.

豐草嵌紋病毒 (*Bidens mosaic virus*, BiMV) (Inoue-Nagata *et al.* 2006; Pavan *et al.* 2008; Suzuki *et al.* 2009), 本研究針對病毒核酸序列分析比對結果顯示 BiMoV 及 BiMV 二者間鞘蛋白胺基酸序列相同度低於 70%, 此在 *Potyvirus* 屬病毒之分類上確實屬於不同之病毒 (Ward *et al.* 1992; Adams *et al.* 2005)。

本研究所製備之 BiMoV 抗血清, 可實用

於 ELISA、西方轉漬法及 SDS-免疫擴散法等檢測, 能有效地檢測 BiMoV 病毒的發生。目前國內尚未有 BiMV 之發生報告, 本研究由萵苣及咸豐草所獲得之 BiMoV 病毒、檢測試劑及其核酸序列資料將可作為此等病毒之鑑定比對依據, 更有助於未來國內對於 BiMoV 發生與其生態的瞭解, 對於 BiMoV 在台灣危害之風險將可提供實際的應用性。

引用文獻 (Literature cited)

- Adams, M. J., J. F. Antoniw, and C. M. Fauquet. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch Virol.* 150:459–479.
- Atreya, P. L., C. D. Atreya, and T. P. Pirone. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in the loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:7887–7891.
- Baker, C. A., I. Kamenova, R. Raid, and S. Adkins. 2007. *Bidens mottle virus* identified in tropical soda apple in Florida. *Plant Dis.* 91:905.
- Baker, C. A., R. N. Raid, and B. T. Scully. 2001. Natural infection of *Vicia faba* by *Bidens mottle virus* in Florida. *Plant Dis.* 85:1290.
- Baker, C. A., E. N. Roskopf, M. S. Irey, L. Jones, and S. T. Adkins. 2008. *Bidens mottle virus* and *Apium virus Y* identified in *Ammi majus* in Florida. *Plant Dis.* 92:975.
- Chang, C. A., D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyvirus. *Phytopathology* 78:1266–1275.
- Chen, C. C. and C. A. Chang. 1998. Characterization of a potyvirus causing mild mosaic on tuberose. *Plant Dis.* 82:45–49.
- Chen, C. C., H. T. Hsu, Y. H. Cheng, C. H. Huang, J. Y. Liao, H. T. Tsai, and C. A. Chang. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. *Bot. Stud.* 47:369–378.
- Chen, C. C., C. H. Huang, J. Y. Liao, T. C. Deng, L. W. Chen, Y. H. Cheng, and C. A. Chang. 2008. Identification of *Bidens mottle virus* infecting lettuce and analysis of its full-length genomic sequence. *Plant Pathol. Bull.* 17:87–88.
- Chen, Y. K. and M. J. Chen. 1994. Lettuce leafroll mosaic- a new lettuce disease caused by caulimovirus-like agent in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 3:209–215.
- Chen Y. K., J. S. Huang, and M. J. Chen. 1995a. Mild mosaic of lettuce-a new virus disease in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 4:91–95. (in Chinese with English abstract)
- Chen, Y. K., Y. C. Peng, T. M. Chen, and M. J. Chen. 1995b. Diagnosis and serological detection of lettuce mosaic virus (LMV) in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 4:60–68. (in Chinese with English abstract)
- Christie, S. R., J. R. Edwardson, and F. W. Zettler. 1968. Characterization and electron microscopy of a virus isolated from bidens and *Lipidium*. *Plant Dis. Rep.* 52:763–768.
- Dujovny, G., T. Sasaya, H. Koganesawa, T. Usugi, K. Shohara, and S. L. Lenardon. 2000. Molecular characterization of a new potyvirus infecting sunflower. *Arch. Virol.* 145:2249–2258.
- Edwardson, J. R. and F. W. Zettler. 1968. Characterization and electron microscopy of a virus isolated from Bidens and Lepidium. *Plant Dis. Rep.* 52:763–768.
- Edwardson, J. R., D. E. Purcifull, R. G. Christie, and S. R. Christie. 1976. Blue lupine, a natural host for Bidens mottle virus. *Plant Dis. Rep.* 60:776.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Huang, C. H. and F. J. Jan. 2011. First report of *Bidens mottle virus* infecting Calendula in Taiwan. *Plant Dis.* 95:362.
- Inoue-Nagata, A. K., P. A. Oliveira, L. S. Dutra, and T. Nagata. 2006. Bidens mosaic virus is a member of the *Potato virus Y* species. *Virus Genes* 33:45–49.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227:680–685.
- Liao, J. Y., C. A. Chang, C. C. Chen, and T. C. Deng. 2001. Isolation and identification of a virus causing sunflower chlorotic spots in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 10:173–180.
- Liao, J. Y., C. C. Hu, C. C. Chen, C. A. Chang, and T. C. Deng. 2009. Full-length sequence analysis of a distinct isolate of *Bidens mottle virus* infecting sunflower in Taiwan. *Arch. Virol.* 54:723–725.
- Logan, A. E., F. W. Zettler, and S. R. Christie. 1984. Susceptibility of Rudbeckia, Zinnia, Ageratum, and other bedding plants to Bidens mottle virus. *Plant Dis.* 68:260–262.
- Maritan, A. C., J. O. Gaspar, and L. E. A. Camargo. 2004. Identification and characterization of a potyvirus isolated from *Zinnia elegans*. *Fitopatol. Bras.* 29:24–29.
- Orsenigo, J. R. and T. A. Zitter. 1971. Vegetable virus

- problems in south Florida as related to weed science. Proc. Fla. State Hort. Soc. 84:168–171.
- Page, R. D. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computer. Comput. Appl. Biosci. 12:357–358.
- Pappu, S. S., H. R. Pappu, C. A. Chang, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. Plant Dis. 82:1121–1125.
- Pavan, M. A., R. Krause-Sakate, N. da Silva, F. M. Zerbin, and O. Le Gall. 2008. Virus diseases of lettuce in Brazil. Plant Viruses 2:35–41.
- Purcifull, D. E. and D. L. Batchelor. 1977. Immunodiffusion Tests with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Treated Plant Viruses and Plant Viral Inclusions. Agricultural Experiment Stations, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Gainesville. 39 pp.
- Purcifull, D. E., S. R. Christie, T. A. Zitter, and M. J. Bassett. 1971. Natural infection of lettuce and endive by bidens mottle virus. Plant Dis. Rep. 55:1061–1068.
- Purcifull, D. E. and T. A. Zitter. 1971. Virus diseases affecting lettuce and endive in Florida. Proc. Fla. State Hort. Soc. 84:165–168.
- Purcifull, D. E. and T. A. Zitter. 1973. A serological test for distinguishing Bidens mottle virus and lettuce mosaic viruses. Proc. Fla. State Hort. Soc. 86:143–145.
- Stace-Smith, R. and J. H. Tremaine. 1970. Purification and composition of potato virus Y. Phytopathology 60:1785–1789.
- Suzuki, G. S., R. A. C. Rosa, M. M. Sanches, D. N. Nozaki, M. A. Pavan, and R. Krause-Sakate. 2009. Characterization of an isolate of *Bidens mosaic virus* (BiMV) from lettuce. Summa phytopathol. 35:231–233.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates. Sunderland. 130 pp.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexibel strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25:4876–4882.
- Tomimura, K., A. J. Gibbs, C. E. Jenner, J. A. Walsh, and K. Ohshima. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent ‘emergence’ in east Asia. Mol. Ecol. 12:2099–2111.
- Ward, C. W., N. M. McKem, M. J. Frenkel, and D. D. Sbukla. 1992. Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. p.283–297. in: Potyvirus Taxonomy (Barnell, O. W., ed.) Springer. New York. 400 pp.
- Wisler, G. C. 1984. Bidens Mottle Virus of Bedding Plants. Plant Pathol. Circular No. 262. Fla. Dept. Agric. & Consumer Services. Tallahassee. 2 pp.
- Youssef, F., A. Marais, and T. Candresse. 2007. Partial genome sequence of *Bidens mottle virus* sheds light on its taxonomy. Arch. Virol. 153:227–228.
- Zitter, T. A. 1976. Viruses Affecting Florida Vegetables: Lettuce and Endive, Description No. 1 Bidens Mottle Virus, Circular S-238. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville. 4 pp.
- Zurawski, D. B., D. E. Purcifull, and J. J. McRitchie. 1980. Bidens Mottle Virus of *Fittonia verschaffeltii*. Plant Pathol. Circular No. 215. Fla. Dept. Agric. & Consumer Services. Tallahassee. 2 pp.

Bidens mottle virus Infecting Lettuce in Taiwan: Identification and Sequence Analysis of Full-Length Viral Genome

Chin-Chih Chen^{2,3}, Ting-Chin Deng², Chun-Huei Huang², Bi-Yun Lin²,
and Jye-Yann Liao²

Abstract

Chen, C. C., T. C. Deng, C. H. Huang, B. Y. Lin, and J. Y. Liao. 2012. *Bidens mottle virus* infecting lettuce in Taiwan: identification and sequence analysis of full-length viral genome. *J. Taiwan Agric. Res.* 61:209–221.

A virus isolate-WF was isolated from lettuce leaves that exhibit yellowing mosaic. WF isolate was positively reacted with potyvirus-specific monoclonal antibody. A 1.3-kb DNA fragment was amplified from RNA of WF isolate with the potyvirus-degenerate primer pair (HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎) by reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR). The identity of deduced amino acid sequence of coat proteins of WF isolate to that of *Bidens mottle virus* sunflower isolate SF-1 (GenBank Acc. NC_014325) was 99.3%. When the antiserum against purified virions of WF isolate was used in SDS-immunodiffusion, identical immunoprecipitation reaction was generated between lettuce isolates WF and the typical isolate of BiMoV (ATCC PV165). WF isolate could be recognized as a strain of BiMoV based on the results of the molecular and serological characterizations. Another lettuce isolate (HL) from Hualien and three isolates from *Bidens pilosa* (B3, B4, B12) were also serologically identical to isolate of BiMoV-PV165 and the identity in amino acid sequences of viral coat proteins were 97%. Full-length of genomic RNAs of BiMoV-WF, HL, B3, B4, and B12 were sequenced deposited into GenBank (accession numbers EU250213, EU250214, EU250212, EU250211, and EU25021, respectively). The phylogenetic analyses based on the deduced amino acid sequences of the full poly-proteins with those of different BiMoV isolates revealed that isolates from the same host was classified into the same group. This is the first report of the full-length genomic sequence and molecular characterization of BiMoV infecting lettuce and bidens.

Key words: *Bidens mottle virus*, Lettuce, Full-length genomic sequences.

-
1. Contribution No. 2681 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: June 18, 2012.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Researcher, Research Assistant, Research Assistant, and Assistant Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.