

胡瓜嵌紋病毒火球花分離株之鑑定與檢測

陳金枝^{1,*} 江芬蘭²

摘要

陳金枝、江芬蘭。2015。胡瓜嵌紋病毒火球花分離株之鑑定與檢測。台灣農業研究 64(1):74–79。

本研究由火球花 (*Haemanthus multiflorus* Martyn.) 葉片呈現黃斑病徵者取其罹病組織，經由汁液機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片所得之單斑 (single lesion) 而獲得 YS1 分離株。續於間接式酵素連結免疫反應 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect-ELISA) 中，火球花自然罹病葉、YS1 分離株所感染之奎藜局部病斑及菸草 (*Nicotiana benthaminana* Domin) 系統性嵌紋病葉等受測樣品，均可與胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 多元抗體產生正反應。而於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 反應中，上述 3 種受測樣品之全量核酸，均可與 CMV 引子對 (CMV-up/CMV-dw) 產生預期大小約 485 bp 之核酸片段。YS1 之鞘蛋白 (YS1-CP) 核酸序列登錄於 GenBank 取得核酸分子序號為 KM066122，YS1-CP 之胺基酸序列與其他已知 CMV 之相同度均高於 90%。由血清學及核酸分子特性之鑑定結果，顯示由火球花分離而得之 YS1 為 CMV 之分離株。CMV 寄主範圍廣泛，本研究之結果乃 CMV 之新寄主紀錄。本研究分別以 TPS (Thomson & Dietzgen 1995) 及自製之 PSE 緩衝液快速萃取罹病植物組織之全量核酸，以其為模板進行 RT-PCR，均可成功增幅出 YS1 病毒之預估核酸片段，結果證實此種核酸快速萃取法可用於 CMV 之核酸快速檢測，具有相當高之應用潛力。

關鍵詞：胡瓜嵌紋病毒、火球花、免疫分析、RT-PCR 快速檢測。

前言

火球花 (*Haemanthus multiflorus* Martyn)，英名 Blood lily，別名紅繡球、血百合、網球花，屬於石蒜科火球花屬多年生之球根花卉，原產於熱帶非洲，國內常作為庭園或盆栽花卉。CMV 為 *Bromoviridae* 科 *Cucumovirus* 屬成員，病毒顆粒為球形多面體，直徑約 28–30 nm (Pacios & Garcia-Arenal 2006)。基因體由 4 段大小不等之 RNA 核酸組成，RNA 3 帶有對應 3a 移動蛋白 (movement protein; MP) 及鞘蛋白 (coat protein; CP) 之核酸序列 (Zitter & Murphy 2009)。CMV 遍佈全球且寄主範圍相當廣 (Francki *et al.* 1979)，包括豆類、茄

科、瓜類、果樹及花卉等重要作物，有將近 100 科超過 1,000 種 (species) 之單子葉及雙子葉植物種類 (Edwardson & Christie 1991)。CMV 可藉由汁液機械傳播或種子傳播 (Ali & Kobayashi 2010)，在自然界乃藉由蚜蟲以非永續型方式傳播 (Zitter & Murphy 2009)。

本研究針對由台中霧峰區火球花植株葉片呈現黃斑病徵 (圖 1A) 所採集之樣品而獲得一種病毒分離株 (代號 YS1)，詳述以血清學及分子生物學診斷鑑定此分離株之結果，並應用核酸快速萃取方式所獲得之罹病組織全量核酸，可成功進行 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 之核酸快速檢測，簡化核酸檢測之流程。

投稿日期：2014 年 7 月 31 日；接受日期：2014 年 11 月 12 日。

* 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

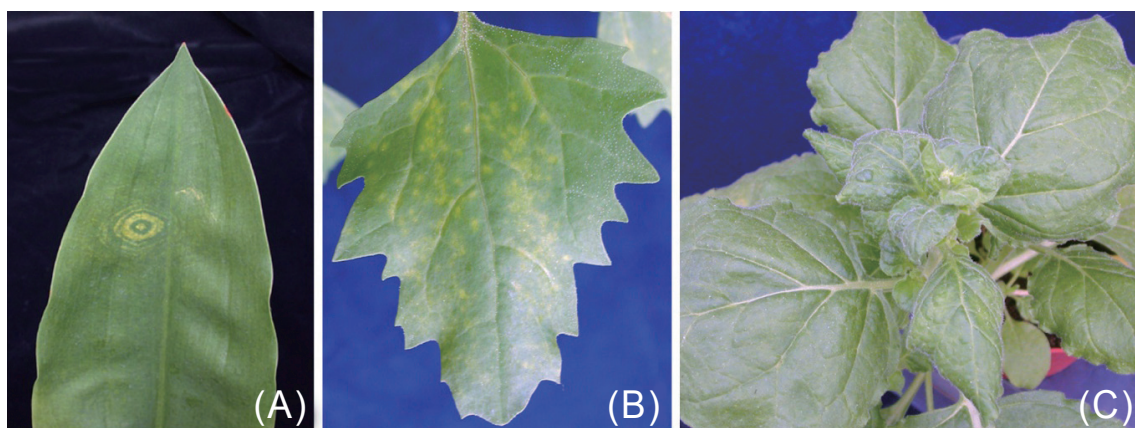


圖 1. *Cucumber mosaic virus* (CMV) 發生於田間火球花上之病徵、由火球花 CMV-YS1 分離株接種奎藜及菸草後產生之病徵。(A) 田間檢出有 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 之火球花葉片上呈現之黃斑病徵；(B) YS1 分離株接種奎藜葉片後出現之局部病斑；及 (C) 接種菸草造成之系統性嵌紋病徵。

Fig. 1. Symptoms observed on leaf of the natural growth blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn) infected by *Cucumber mosaic virus* (CMV), and symptoms developed on *Chenopodium quinoa* and *Nicotiana benthamiana* caused by the YS1 isolate from blood lily. (A) Yellow spot observed on leaf of CMV-infected bloody lily; (B) Local lesions on leaf of *C. quinoa*; and (C) Systemic mosaic on plant of *N. benthamiana*.

材料與方法

自台中市霧峰區之私人庭園所栽種的火球花植株上，採取葉片呈現黃斑病徵之罹病組織進行相關試驗。於接種試驗中，將火球花黃斑組織以 0.05 M 之磷酸鉀緩衝液 (potassium phosphate buffer, pH 7.5)，依 1 : 10 (g mL⁻¹) 比例研磨成汁液，將研磨汁液接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片上，接種後約 3–4 d 於奎藜葉片上產生黃化局部斑點 (圖 1B)，挑取單一病斑經 3 次重複接種篩選，獲得一分離株，其代號為 YS1。將 YS1 繁殖於奎藜葉片之局部病斑 (local lesions) 研磨汁液接種於菸草 (*Nicotiana benthamiana* Domin.) 上，約 5–7 d 後產生系統性嵌紋病徵 (圖 1C)。

於血清法鑑定中，將火球花黃斑罹病組織及 YS1 分離株感染後之奎藜單斑與菸草病葉組織，與本研究室以往所製備及保存之菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*; TMV)、番椒黃化病毒 (*Capsicum chlorosis virus*; CaCV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) (Chen *et al.* 2000) 等多元抗體，以及市售之 *Potyvirus* 屬單元抗體 (Agdia Inc., USA) 等，

以間接式酵素連結免疫吸附分析法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 進行反應分析。ELISA 步驟乃參照以往研究進行 (Clark & Adams 1977)，最終呈色反應加入濃度為 1 mg mL⁻¹ 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-NPP) (Amresco, Solon Ind., USA)。加入 p-NPP 溶液反應 40 min 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，樣品吸收值大於 2 倍之健康葉片吸收值者視為正反應。

結果與討論

根據試驗結果，發現受測罹病樣品均僅與 CMV 之抗體產生明顯正反應，其 ELISA 讀值 (A₄₀₅) 均在 1.5–3.0 之間 (結果未列出)，且其他無黃斑病徵之火球花植株對照，亦未檢出 CMV 反應。根據血清學鑑定結果顯示，由火球花黃斑罹病組織分離之 YS1 病毒株乃與 CMV 有血清關係之病毒。

核酸分子鑑定與檢測方面，以植物核酸微量萃取試劑組 (RNeasy Plant Mini kit, Qiagen, Germany) 所建議之純化流程，進

行 YS1 分離株繁殖於奎藜的局部病斑全量核酸 (total RNAs) 之萃取與純化，以可增幅 CMV RNA 3 核酸分子之引子對 CMV3a-up/CMVCP-dw (5'GTCCRCRCATKTGWGTC-GTG/5'ATTTCTCCACGACTGA CCA T) 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse-transcription polymerase-chain reaction; RT-PCR)，此引子對預期可增幅包含 CMV 之 3a 移動蛋白 (MP) 及鞘蛋白 (CP) 共約 2.2 kb 之核酸片段。反應乃參照單步驟 RT-PCR 試劑組 (GeneMark Technology Co. Ltd., Tainan, Taiwan) 提供之配方進行，於總體積為 25 μ L 之反應液中混合有 2 μ L 之受測樣品全量核酸、各 2.5 μ L 之 10 μ M CMV3a-up/CMVCP-dw 引子。於熱循環反應儀 (GeneAmp Model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA) 中進行核酸增幅反應。反應條件為 50°C 進行反轉錄反應 30 min，94°C 下變性 1 min，50°C 下煉合 50 s，72°C 下聚合 2 min，共 26 個循環，最後一個步驟以 72°C 聚合 6 min，增幅之產物以 1.2% agarose 進行電泳分析。受測樣品之 PCR 產物經核酸電泳分析，獲得一個與預估相符約 2.2 kbp 之核酸片段 (結果未列出)。將此核酸片段構築於 pCRII-TOPO 載體上 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，篩選具有預估 PCR 產物之轉型株，送交明欣生物科技有限公司 (台北，台灣) 進行核苷酸定序。

分析結果顯示，YS1 分離株之 2.2 kb 核

酸片段內含有對應 CMV 之 3a 移動蛋白 (MP) 及鞘蛋白 (CP) 之完整轉譯架構 (open reading frame) (Hwang *et al.* 2007)，於對應 MP 部分包含 834 個核苷酸，可轉譯出 278 個胺基酸之蛋白序列；而對應 CP 部分包含有 657 個核苷酸，可轉譯出 219 個胺基酸之蛋白序列。YS1-CP 之核酸序列經登錄於 GenBank 取得核酸分子序號為 KM066122。YS1-CP 與研究室所保存之彩色海芋 CMV-CWF1 分離株 (GenBank Acc. no. KM111300) 以及以往發表之港口馬兜鈴 CMV-Az1 分離株 (Chen *et al.* 2000) 之鞘蛋白胺基酸序列相同度分別達 98.6 及 93.6%，而與 GenBank 上已登錄之其他 3 種 CMV 之鞘蛋白胺基酸序列相同度均達 90% 以上 (表 1)。

此外，以 CMV-up/CMV-dw 引子對 (5'-TATGAT AAGAARCTTGTT TCG/5'-GCCGTAAGCTG-GATGGACAA, Singh *et al.* 1995) 就火球花自然罹病葉、YS1 分離株所感染之奎藜局部病斑及菸草 (*N. benthaminana*) 系統性嵌紋病葉、以及馬兜鈴 CMV-Az1 對照組等全量核酸進行 RT-PCR 反應，反應條件如上所述，但引子對黏合溫度為 52°C。結果顯示，上述受測樣品，均可產生預期大小約 485 bp 之核酸片段 (結果未列出)。

根據上述血清反應與核酸分子特性之鑑定結果，由原始罹病火球花組織、YS1 分離株所感染之奎藜局部病斑及菸草系統性嵌紋病

表 1. 火球花 YS1 分離株之鞘蛋白核酸序列與其他 *Cucumber mosaicvirus* (CMV) 病毒之相同度比對。

Table 1. Comparison of the nucleotide (nt) and amino acid (aa) identities of the coat protein of the virus isolate YS1 from blood lily with those of the different isolates of *Cucumber mosaic virus* (CMV).

Virus isolate (Acc. No.) ^y	CP-nt length	% identity of CP ^z	
		nt	aa
YS1 (KM066122)	657	100.0	100.0
Az1 (KJ907379)	654	98.2	93.6
CWF1 (KM111300)	654	97.4	93.2
Y (D12499)	654	92.1	92.2
Ca-P1 (DQ777747)	651	91.6	90.0
Fny (NC001440)	654	92.7	91.8

^z Percent identities of the respective nucleotide and amino acid sequences were analyzed by the program of Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Wisconsin, USA).

^y The CMV isolates used for comparison are: Az1 from *Aristolochia zolligeriana* Martyn. (Chen *et al.* 2000), CWF1 from calla lily (Acc. no. KM111300), and three other isolates (Y, Ca-P1 and Fny) are available in GenBank.

葉均能同時檢測到 CMV，於此等生化反應結果證實由火球花所分離之 YS1 分離株，屬於 *Cucumovirus* 之胡瓜嵌紋病毒成員。本研究可將 YS1 繁殖於奎藜或菸草之罹病組織作為接種源，但以汁液機械接種法並未能成功將其回接於健康火球花植株造成黃斑病徵，其在田間環境下之是否經由蟲媒而自然傳播與感染尚待釐清。本試驗中比較 25 棵無病徵之火球花葉片組織與分離出 YS1 之火球花黃斑病徵罹病株，進行其 CMV 檢測，結果僅於此出現黃斑病徵之植株樣品可檢出 CMV，並於血清學及核酸分子鑑定試驗證明其為 CMV 病毒分子無誤。本研究之結果乃首次紀錄了火球花為 CMV 之天然寄主。

於開發火球花 CMV-YS1 分離株之核酸快速檢測上，參考 Thomson & Dietzgen (1995) 已發表之 TPS 緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 1.0 M KCl, 10 mM EDTA) (Thomson & Dietzgen 1995)，改良其核酸萃取步驟並自行調配一種萃取緩衝液 PSE (0.2 M KPB, 1 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.4) 進行試驗。取 YS1 繁殖於菸草之罹病組織 0.1 g 研磨均質，再與 400 μ L 之核酸萃取緩衝液混合均勻，並於 25、40 及

60°C 等不同溫度下處理 10 min 後，取此萃取液之上清液再經無菌水稀釋 10 倍後作為 RT-PCR 之模板。所使用之引子對為 CMV-up/CMV-dw，RT-PCR 反應液組成及反應條件如上述。結果顯示，YS1 之菸草罹病組織以 TPS 或 PSE 核酸萃取液所獲得之全量核酸，於 3 種溫度處理者，均能成功於 RT-PCR 反應中檢出 YS1 核酸分子，獲得預期大小 485 bp 之核酸片段 (圖 2A)，與以核酸純化試劑組 (Plant RNA kit GeneMark Technology Co. Ltd., Taiwan) 所得之全量核酸為模板者之結果相同 (圖 2A)。本研究以此核酸快速萃取法進行田間火球花 CMV 罹病組織之 RT-PCR 檢測，也同時能成功檢出此 485 bp 核酸片段 (圖 2B)。此等結果顯示，以 TPS 或 PSE 核酸萃取液作為快速萃取 CMV 罹病組織所得之全量核酸，能成功應用於火球花 CMV 之 RT-PCR 快速檢測。

Thomson & Dietzgen (1995) 簡化了植物組織全量核酸之萃取流程，在不使用 Phenol/Chloroform 等有機溶媒法或是市售核酸純化試劑組條件下，可在不將植物組織均質化之步驟下，透過溫度處理將核酸於短時間內釋出，成功地檢出 DNA 或 RNA 作物病毒。國內研究

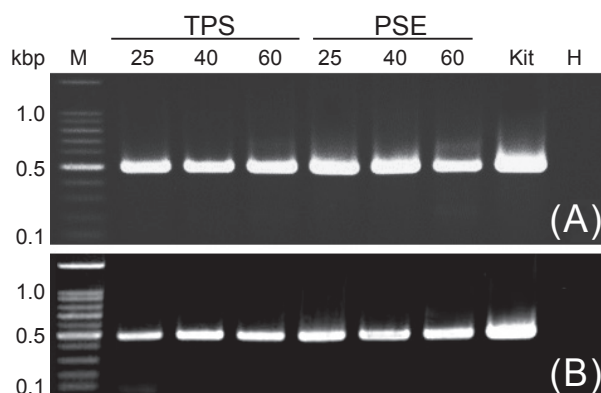


圖 2. 以 TPS 或 PSE 緩衝液進行 *Cucumber mosaic virus* 核酸快速萃取以進行反轉錄-聚合酶連鎖反應結果。(A) 接種 CMV-YS1 之菸草罹病組織；(B) 田間之火球花 CMV 罹病組織。

Fig.2. Reverse-transcription polymerase-chain reaction of *Cucumber mosaic virus* (CMV) by the method of rapid RNA extraction with TPS or PSE buffer. (A) Diseased tissues of *Nicotiana benthaminana* infected with CMV-YS1. (B) Diseased tissues of CMV-infected blood lily in field. The buffers for the extraction of plant total RNAs were TPS buffer (reported by Thomson & Dietzgen 1995) and PSE buffer prepared in this study. A predicted 485-bp DNA fragment was respectively amplified from the diseased total RNAs extracted by the rapid extraction method with the buffers TPS or PSE. Lane M, the molecular marker; Lane 25, 40, and 60, temperature ($^{\circ}$ C) treated leaf extractions; Lane Kit, leaf extraction by the kit of Plant RNA ; and Lane H, the healthy control.

上，應用 Thomson & Dietzgen (1995) 所開發之 TPS 緩衝液於蘭花病毒 CymMV 和 ORSV (Chen *et al.* 2009) 及筆者應用於花卉病毒檢測上 (Chen *et al.* 2012)，均可快速檢測到病毒核酸分子，然而需視所使用之核酸萃取緩衝液、作物來源及病毒種類而作適當的調整。本研究應用此簡易快速的植物核酸萃取概念與方法並加以改良後，同樣可達到快速檢測火球花 CMV-YS1 病毒之目的；此外，本研究於 25°C 之室溫條件下便可成功獲得 CMV 之核酸供 RT-PCR 檢測，更可省略定溫加熱器之使用，整體過程簡易快速、省電且環保。

本研究證明以 PSE 核酸萃取液可成功應用於火球花 CMV 之核酸檢測，此等結果可供開發其他植物病毒核酸快速檢測之參考模式。本研究除證明火球花為 CMV 之天然寄主外，並已實務應用於火球花種球之病毒檢定監測，而能使得進口種球之病毒檢疫監測更臻完整。

引用文獻

- Ali, A. and M. Kobayashi. 2010. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper. *J. Virol. Methods* 163:234–237.
- Chen, C. C., C. A. Chang, M. J. Lin, and H. S. Fang. 2000. Identification for the infection of cucumber mosaic cucumovirus on *Aristolochia zolligeriana*. *Plant Pathol. Bull.* 9:29–34. (in Chinese with English abstract)
- Chen, C. C., F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and C. A. Chang. 2012. Application of easy-extraction of plant total RNA on RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus infecting ornamental crops. *Plant Pathol. Bull.* 21:159. (in Chinese with English abstract)
- Chen, S. J., C. C. Chen, T. C. Chen, Y. H. Cheng, and C. A. Chang. 2009. Development and evaluation of nucleic acid quick extraction technique in the detection of orchid viruses. *Plant Pathol. Bull.* 18:94. (in Chinese with English abstract)
- 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.
- Edwardson, J. R. and R. G. Christie. 1991. Cucumoviruses. p.293–319. *in: CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes.* (Edwardson, J. R. and R. G. Christie, eds.) CRC Press. Boca Raton. 680 pp.
- Francki, R. I. B., D. W. Mossop, and T. Hatta. 1979. *Cucumber mosaic virus*. CMI/AAB, Descriptions of Plant Viruses, No. 213. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=213> (visit on 7/15/2014)
- Hwang, M. S., K. N. Kim, J. H. Lee, and Y. I. Park. 2007. Identification of amino acid sequences determining interaction between the cucumber mosaic virus-encoded 2a polymerase and 3a movement proteins. *J. Gen. Virol.* 88:3445–3451.
- Pacios, L. F. and F. Garcia-Arenal. 2006. Comparison of properties of particles of *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus* based on the analysis of molecular surfaces of capsids. *J. Gen. Virol.* 87:2073–2083.
- 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 Dis.* 79:713–716.
- Thomson, D. and R. G. Dietzgen. 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without homogenization. *J. Virol. Methods* 54:85–95.
- Zitter, T. A. and J. F. Murphy. 2009. *Cucumber mosaic virus*. *Plant Health Instructor.* <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/Cucumber-mosaic.aspx> (visit on 7/15/2014)

Identification and Detection of *Cucumber mosaic virus* Isolated from Bloody Lily (*Haemanthus multiflorus*)

Chin-Chih Chen^{1,*} and Fen-Lang Chiang²

Abstract

Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2015. Identification and detection of *Cucumber mosaic virus* isolated from bloody lily (*Haemanthus multiflorus*). J. Taiwan Agric. Res. 64(1):74–79.

A yellow spot symptom observed on leaves of blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn.) plant was used for virus identification. Later, a virus isolate (YS1) was obtained from single-lesion isolation by mechanical inoculation of this diseased tissue extracts to leaves of *Chenopodium quinoa* Willd. Extracts of the diseased blood lily, local lesions on leaf of *C. quinoa* and systemic mosaic leaf tissues of *Nicotiana benthamiana* caused by YS-1 were all reacted strongly with the antiserum against *Cucumber mosaic virus* (CMV) in indirect enzyme-linked immunosorbent assay. An expected size of 485-bp DNA fragment was amplified from total RNAs of the field blood lily sample, YS1-infected *C. quinoa* and *N. benthamiana* by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the primer pair of CMV-up/CMV-dw. The nucleotide sequence of coat protein (CP) region of YS1 isolate was determined and submitted to the GenBank with the accession number KM066122. The amino acid sequence of YS1-CP shared higher than 90% identity with those of known CMV isolates. Based on the results of serological assay and molecular evidence, it indicated that YS1 isolated from blood lily was an isolate of CMV. Although CMV distributes worldwide and has a large host range. This is the first report to demonstrate that blood lily is a nature host of CMV in Taiwan. Total RNAs of YS1-infected plant tissues obtained by the rapid extraction way with TPS (Thomson & Dietzgen 1995) or PSE buffer (prepared in this study) were all successfully applied on the RT-PCR analysis of YS1. The potential use of the rapid extraction of plant total RNAs for RT-PCR amplification of CMV is proved in this study.

Key words: *Cucumber mosaic virus* (CMV), Blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn.), Serological assay, Rapid detection with RT-PCR.

Received: July 31, 2014; Accepted: November 12, 2014.

* Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.