

由火球花所分離之 *Nerine latent virus* 之血清學及 分子生物學鑑定

陳金枝^{1,*} 張清安^{2,*} 江芬蘭³

摘要

陳金枝、張清安、江芬蘭。2016。由火球花所分離之 *Nerine latent virus* 之血清學及分子生物學鑑定。台灣農業研究 65(2):194–206。

由未呈現病徵之火球花 (*Haemanthus multiflorus* Martyn) 植株葉片，經機械接種於萋藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片後出現局部斑點病徵，以3次連續單一斑點分離獲得1個分離株(HM4)。將感染HM4之火球花及其接種後之萋藜單斑組織於間接式-酵素連結免疫分析法(indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA)及西方墨點法中，均可與已知之*Nerine latent virus* (NeLV) 金花石蒜分離株(NeLV-LY56)之抗血清產生正反應。於反轉錄-聚合酶連鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)中應用NeLV-up/Oligo-d(T)₁₄引子對，可增幅出HM4基因體核酸3'端約1.5 kbp之片段，經解序後證實此片段涵蓋NeLV之全長度鞘蛋白(coat protein; CP)及富含半胱氨酸蛋白(cysteine-rich protein; CRP)之轉譯架構(open reading frame)。將HM4及其他6個選殖自火球花之*Carlavirus*屬病毒分離株核酸序列，與GenBank上已登錄之NeLV(Acc. no. JQ395044)進行分析比對，結果顯示此等病毒序列於鞘蛋白核苷酸及胺基酸相同度(identity)均可達96–99%，確認HM4及其他6個選殖序列均為NeLV。將此7個火球花NeLV選殖株與來自金花石蒜(*Lycoris aurea*)、孤挺花(*Hippeastrum hybridum* Hort.)及水仙(*Narcissus* spp.)之NeLV分離株之CP序列進行類緣分析(phylogenetic analyses)，發現此等序列均同屬NeLV群組，而火球花分離株則自成1個類緣分支。由上述血清學及核酸分子鑑定、類緣分析結果顯示，自火球花上所分離之HM4及其他選殖株均為NeLV之成員。本試驗亦證實，利用對應NeLV金花石蒜分離株之抗血清於indirect ELISA及西方墨點法等免疫檢測中，可順利檢測火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙等不同寄主受NeLV感染之樣品。且其結果與利用HM4核酸序列所設計之引子對(NeLV552u/NeLV552d)進行RT-PCR檢測之結論相符。本研究於2006–2014年期間以indirect ELISA法調查台灣地區火球花等4種石蒜科花卉之NeLV感染率[(檢出數/樣品數) × 100%]，結果分別為火球花18.4%、金花石蒜32%、孤挺花79%及水仙13.3%，且印證受NeLV單獨感染者均未顯現病徵。經血清學與分子生物學鑑定結果，本研究亦首次證實火球花為NeLV之天然寄主。

關鍵詞：火球花病毒病、納麗石蒜潛隱病毒、血清檢測、RT-PCR 檢測、類緣分析。

前言

石蒜科 (*Amaryllidaceae*) 植物種類繁多，高達90屬1,200種以上，分布全球。包含有水仙屬、孤挺花屬、納麗石蒜屬及石蒜屬等

觀賞用種類，台灣也是多種石蒜原生種之分布地。火球花 (*Haemanthus multiflorus* Martyn)，英名Blood lily，別名紅繡球、血百合或網球花。原產於熱帶非洲，為石蒜科火球花屬 (*Haemanthus* spp.) 之球根花卉，為常見之

投稿日期：2015年7月29日；接受日期：2015年10月5日。

* 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw; cachang@cyut.edu.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 朝陽科技大學應用化學系教授。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

庭園或盆栽花卉。目前國外對火球花之病毒發生記錄闕如，筆者等於 2005 年起陸續於火球花上診斷鑑定出幾種病毒病害，包括引起黃色輪斑病徵之番椒黃化病毒 (*Capsicum chlorosis virus*; CaCV) (Chen *et al.* 2009) 及引起黃化葉斑之胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*) (Chen & Chiang 2015)。*Nerine latent virus* (NeLV) 為 *Betaflexiviridae* 科、*Carlavirus* 屬之病毒，病毒顆粒為長絲狀，大小約 660–665 nm。NeLV 首次於納麗石蒜 (*Nerine* spp.) 上被發現與鑑定，1972 年被正式定名，並由 Maat (1978) 確立其病毒特性及血清學之鑑定。此病毒普遍發生於石蒜科 (*Amaryllidaceae*) 之納麗石蒜屬植物 (*Nerine* spp.)，罹病植株通常不顯現病徵 (Maat *et al.* 1978; Derks & Maat 1995)。已記錄之天然寄主尚包括石蒜科的南美水仙 (別名亞馬遜百合, *Eucharis grandiflora*) (Jayasinghe & Dijkstra 1979)、孤挺花 (*Hippeastrum* spp.) (Brolman-Hupkes 1975; Wylie & Jones 2012) 及水仙 (*Narcissus* spp.) (Wylie & Jones 2012) 等。國內之金花石蒜 (*Lycoris aurea*) (Chen *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005)、孤挺花及進口水仙上均有鑑定出此病毒之發生 (Chen *et al.* 2005)，且 NeLV 單獨感染此等寄主均引起隱微型病徵。

Carlavirus 屬之成員均可經由機械傳播方式感染其他寄主 (King *et al.* 2012)，其中 *Potato virus S* (PVS)、*Potato virus M* (PVM) 及 *Potato latent virus* (PoLV) 被報導可經由蚜蟲 (*Myzus persicae*) 以非永續性方式傳播 (MacKinnon 1974; Bratney *et al.* 2002)，本屬病毒目前尚無種子傳播之紀錄 (Hakkaart *et al.* 1975)。而 NeLV 可經由帶毒之無性繁殖體 (如種球或種苗) 傳播，可傳播 NeLV 之蟲媒種類未知 (Derks & Maat 1995)。

NeLV 之核酸序列於 2010 年始發表於美國國家信息中心基因資料庫 (NCBI GenBank)，登錄序號 (accession no.) 包括 HM119498、HM119495、HM119496 及 HM119497。終於促使往後在 NeLV 之鑑定上有明確之依據，並因而據此核酸分子鑑定與分析，得以釐清 1978 年後由不同學者於石蒜科作物上所分離鑑定的 *Carlavirus* 屬病毒之分類地位 (Wylie

& Jones 2012)。例如，以往僅由血清學及寄主反應而被歸類於可能與 NeLV 是相同病毒的 *Hippeastrum latent virus* (HLV) (Maat *et al.* 1978)，透過核酸序列鑑定已確認兩者為完全不同種之病毒 (Wylie & Jones 2012)；另外，2006 年中國大陸學者 (Chen *et al.* 2006) 於水仙上分離而得之 *Carlavirus* 分離株，因當時 NeLV 核酸序列尚未被公開發表而無法比對，乃依據病毒分子核酸序列之獨特性將其鑑定命名為 *Narcissus symptomless virus* (NSV)，現今與已發表之 NeLV 鞘蛋白核酸序列比對分析後，應歸為 NeLV 的分離株 (Wylie & Jones 2012)。

筆者等人於 2004 年期間，由台灣本土性球根花卉金花石蒜上分離鑑定出 1 種屬於 *Carlavirus* 屬的病毒，與當時 GenBank 上已登錄之病毒核酸序列比對，尚未發現相同類緣病毒，故曾依據其單獨感染之植株未出現病徵之特性，將其命名為 *Lycoris virus T* (簡稱 LVT) (Chen *et al.* 2004)。LVT 分離株 -LY56 (GenBank Acc. no. JX880023) (Chen *et al.* 2004)，經與 GenBank 上之 NeLV 鞘蛋白序列比對後，亦證實為 NeLV 分離株之一。金花石蒜 NeLV 分離株之病毒顆粒長度約 617 nm，鞘蛋白分子量估算約 32.7 kDa。本實驗室已製備完成對應 LY56 分離株純化病毒顆粒之多元抗體，並確認可應用於病毒之免疫檢測與鑑定 (Chen *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005)。此外，NeLV 可機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片形成單斑，此特性亦可作為無病徵表現者受 NeLV 感染之鑑定依據。

本研究由無病徵之火球花葉片上分離出 1 種屬於 *Calavirus* 屬之絲狀病毒，並發現與金花石蒜 NeLV-LY56 分離株之抗血清 (Chen *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005) 可產生正反應。後續將此分離自火球花的病毒之鞘蛋白基因加以選殖、解序並分析比對後，證實其即為 NeLV 之分離株。本研究並且確認此病毒可以藉由 indirect ELISA 及所開發之專一性引子對於 RT-PCR 下進行例行檢測及鑑定。田間調查發現 NeLV 已普遍發生於金花石蒜、孤挺花、水仙及火球花等石蒜科花卉。

材料與方法

病毒來源、接種及保存

本研究於 2006 年，採集位於霧峰之行政院農委會農業試驗所附近庭園種植之火球花植株葉片進行病毒之分離與鑑定，選取與金花石蒜 NeLV-LY56 病毒分離株抗血清有正反應之葉片，進行後續試驗。接種試驗方面，將葉片組織 1 g 以 10 mL 之 0.05 M (pH 7.5) 磷酸鉀緩衝液 (potassium phosphate buffer) 研磨成粗汁液，以機械接種法接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片，約 10 d 後產生黃化局部病斑；進行連續 3 次單斑分離接種後，獲得一分離株 (代號 HM4)，做為本研究各項試驗用之代表性分離株。2006–2014 年期間陸續於火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙植株採集原寄主之罹病組織進行試驗，並將所得之罹病組織切成約 1 cm 正方形小組塊，浸漬於 50% (v/v) glycerol 溶液中並保存於 -20°C 下，做為長期保存材料。

抗血清免疫檢測分析

酵素連結免疫吸附反應 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)：本研究採用 indirect ELISA 法進行 NeLV 於火球花及其他石蒜科花卉包括金花石蒜、孤挺花及水仙之鑑定及檢測調查，以釐清 NeLV 於此等花卉上之發生概況。

Indirect ELISA 法乃參照以往研究報告進行 (Chang *et al.* 1988; Chen *et al.* 2013)。其反應步驟如下：(1) 病組織覆膜反應：取新鮮葉片 0.1 g 磨碎，加入 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 混合，取組織液添加於 96 孔 ELISA 反應盤中 (100 μL 孔⁻¹)，每樣品 2 個重複，置於 37°C 生長箱 4 h (或 4°C 隔夜)；然後以 1× PBST (137 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 0.05% Tween 20) 沖洗 3 次；(2) 與受測病毒之抗體反應：以 NeLV-LY56 抗體的免疫球蛋白 (IgG) 之 1,000× 稀釋反應液，添加於各反應孔中 (100 μL 孔⁻¹)，於 25°C 定溫反應 3–4 h (或 4°C 隔夜)，之後以 1× PBST 沖洗 3 次；(3) 與二次抗體反應：加入已稀釋 6,000×

之鹼性磷酸酶酵素連結山羊抗兔 IgG (AP-conjugate goat anti-rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, USA), 100 μL 孔⁻¹，置於 25°C 之定溫箱反應 3–4 h；再以 1× PBST 沖洗液沖洗 3 次；(4) 呈色反應：加入濃度為 1 mg mL⁻¹ 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-nitrophenyl phosphate, p-NPP) (Amresco, Solon Ind., Ohio, USA), 150 μL 孔⁻¹，反應 30–40 min，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值。樣品吸光值大於健康葉片吸光值 2 倍者，判讀為檢出病毒之正反應。

西方墨點法 (western blotting test)：本研究採用西方墨點法進行 NeLV 於火球花罹病組織及其奎藜單斑之血清學鑑定，另針對金花石蒜、孤挺花及水仙之罹病組織亦以相同方式進行檢測，以確認 NeLV 之發生。

試驗步驟如下：取 0.1 g 罹病葉組織，以適量液態氮磨碎後，加入 200 μL 之樣品處理液 (240 mM Tris-HCl, pH 6.8; 10% glycerol, 2% SDS, 4% β -mercaptoethanol) 混合均勻，取 100 μL 研磨液加入等體積之 LDS 溶液 (250 mM Tris-HCl, 含 2% (w/v) SDS, 4% (w/v) 2-mercaptoethanol 及 10% (w/v) sucrose (Laemmli 1970) 混勻後，以沸水悶 3 min，放置涼後可於 -20°C 冷凍保存。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)，之後與 NeLV-LY56 病毒抗體進行血清反應。將 PVDF 膜依反應步驟依次移入稀釋 1,000× 之 NeLV-LY56 IgG 的抗體溶液 (1 mg mL⁻¹)、稀釋 6,000× 之 AP-conjugate 山羊抗兔免疫球蛋白中，各於室溫下反應 1 h，每步驟間均以 1× TBST 浸泡洗 2 次 (每次 10 min)。最終加入 BCIP/NBT 呈色液 (Alkaline phosphatase substrate kit, Bio-Rad, Hercules, CA) (Blake *et al.* 1984) 反應之，依據藍黑色反應條帶做為判斷之依據。

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)：本試驗選用與 NeLV-LY56 抗體產生

正反應之火球花罹病組織，進行對應病毒鞘蛋白核酸序列之片段增幅以供選殖與定序。進行步驟如下：(1) 罹病植物組織全量核酸之純化，本試驗依據商業化植物核酸微量萃取試劑組 (Plant Total RNA mini kit, Viogene, Viogene-BioTek Corporation, Taipei, Taiwan) 之指示，進行供試植物全量核醣核酸 (RNA) 之萃取；(2) RT-PCR 增幅核酸片段，以植物全量 RNA 為模版，利用引子對 NeLVup (5'-ACCCTTCTACT-TAATCGTGTCTTTG-3') 和 Oligo-d(T)₁₄，進行 RT-PCR 反應，預估可獲得病毒 3' 端核酸片段大小約 1.5 kbp 之增幅產物。RT-PCR 乃以商業化單步驟 RT-PCR 試劑組 (Faith Technology Co. Ltd., Taichung, Taiwan) 進行反應，反應管混合以 2 μ L RNA、5 μ L 之 5 \times RT reaction buffer、0.5 μ L 之 RT enzyme mix、15.5 μ L 之 nuclease free water 及各 1 μ L 之 10 μ M 引子對，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Germany) 中進行。反應條件為 50 $^{\circ}$ C 下進行反轉錄反應 30 min，再以 94 $^{\circ}$ C 下變性 1 min，50 $^{\circ}$ C 下煉合 50 s，72 $^{\circ}$ C 下聚合 2 min 為 1 循環，共進行 30 個循環，最後一個步驟以 72 $^{\circ}$ C 聚合 6 min。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 1.5 kbp DNA 片段選殖於 pGEM[®]-T Easy 載體上 (Promega, Madison, WI, USA)，再轉型於 *E. coli* DH5 α 宿主中，並進行其質體 DNA 之純化，利用 *Eco*RI 限制酵素切割法篩選出含有預估嵌入片段之選殖株，送交核酸定序公司 (明欣生物科技有限公司，台灣台北市)，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., Bethesda, MD, USA) 軟體進行分析比對，並與 GenBank 上已登錄之 NeLV 病毒核酸序列進行鞘蛋白基因序列之比對。本試驗除火球花 HM4 分離株外，另針對其他來自 6 個火球花 *Carlavirus* 罹病組織之病毒分離株 (HM15、HM94W6、HM03w1、HM03w2、HM03T2、HM03T5) 進行其 3' 端

大小約 1.5 kbp 核酸片段之選殖與定序分析。

感染火球花 NeLV 分離株與其他石蒜科病毒分離株之類緣關係比對：本試驗乃選取研究室取自火球花 (HM4、HM15、HM94W6、HM03w1、HM03w2、HM03T2、HM03T5)、金花石蒜 (LY56、LYL39、LY7、LY9)、孤挺花 (ALGC6、ALWF36、ALHL14)，及水仙 (Nar86、Nar87) 等 NeLV 分離株，及 GenBank 上已登錄之 NeLV 序列進行比對。另以同為 *Carlavirus* 屬之孤挺花潛隱病毒 (*Hipeastrum latent virus*; HLV) 及 *Narcissus common latent virus* (NCLV) 作為對照分析之外集團 (outgroup)。針對對應 CP 區域之胺基酸序列進行類緣演化分析 (phylogenetic analysis)，分析方法依據 Tomimura *et al.* (2003) 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 (neighbor-joining) 結合 BRM 法 (bootstrap resampling method) (Felsenstein 1985; Thompson *et al.* 1997) 作分析。其中 bootstrap values 乃由逢機重複 1,000 次取樣所計算之結果，所得之類緣演化樹以 TreeView 程式顯示 (Page 1996)。

NeLV 核酸引子對之專一性檢測：以 HM4 等不同火球花分離株之核酸序列為模板，設計一組引子對 NeLV552u/NeLV552d (5'-ACGTCCTGCATTGAAGCCTAT-3'/5'-AGTTGCCTATGTGTGGCGTTA-3') 以進行 RT-PCR 檢測。檢測對象包括火球花、金花石蒜、孤挺花和水仙之罹病組織，以及火球花、金花石蒜、孤挺花接種奎藜後之單斑。RT-PCR 方法設定反應程序如上所述，預估可增幅出大小約 552 bp 之核酸片段。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠進行分析。

結果

接種試驗及免疫檢測

與 NeLV-LY56 抗體產生正反應之無明顯病徵之火球花葉片，將其機械接種於奎藜 (*C. quinoa*) 葉片，約 10 d 左右於葉片上形成局部

斑點。試驗中發現與 NeLV-LY56 抗體有反應之火球花樣品，當接種於奎藜葉片時均可產生局部斑點反應，此在無病徵表現而與 NeLV-LY56 抗體有反應之金花石蒜及孤挺花之樣品上亦獲得相同結果，原始罹病組織與奎藜單斑均於 indirect ELISA 中產生正反應讀值 (結果未出示)。

以西方墨點法進行檢測之結果顯示，火球花罹病葉片及其奎藜單斑均可於分子量約 32.7 kDa 處呈現與 NeLV-LY56 抗體產生正反應之蛋白條帶 (圖 1)，此與其他石蒜科花卉包括金花石蒜、孤挺花及水仙等分離株之反應結果相仿。然而奎藜樣品大約於 32.7 kDa 處呈現較明顯且均一之蛋白質反應條帶，而原始寄主罹病組織之 32.7 kDa 蛋白條帶濃度則較低，且尚有其他分子量略低之蛋白條帶存在 (圖 1)，推測乃因主蛋白條帶遭受裂解所造成之現象。本試驗中，火球花等石蒜科花卉樣品均與 NeLV-LY56 抗體產生正反應，也呼應於 indirect ELISA 中產生之正反應，顯示此等感染不同石蒜科花卉之 NeLV 分離株之間的血清類緣關係密切。

火球花分離株之鞘蛋白核酸序列分析

將火球花 HM4 分離株，以 NeLVup/Oligo-d(T)₁₄ 引子對進行其 3' 端核酸片段之 RT-PCR 增幅反應後，於電泳分析中可獲得一預估值約 1.5 kbp 之核酸片段 (結果未出示)，經選殖與定序結果顯示其乃包含 1,560 個核苷酸 (不包括 3' 端之 poly A)。HM4 此片段與 GenBank 上已登錄之水仙分離株 NeLV-Marijiniup 5 (Acc. No. JQ395044) 之核苷酸及胺基酸相同度均高達 97% 以上 (表 1)。其中，對應 HM4 全長度鞘蛋白之轉譯架構 (open reading frame of coat protein, CP ORF) 有 891 個核苷酸，預估可轉譯出 297 個胺基酸；對應「富含半胱氨酸蛋白」(cysteine-rich protein; CRP) 者有 405 個核苷酸，預估可轉譯出 135 個胺基酸。由上述 3' 端 1,560 個核苷酸序列比對結果，顯示 HM4 與 NeLV 乃 *Carlavirus* 屬同種之病毒。所獲之 HM4 核酸序列已登錄於 GenBank 資料庫，序號為 KC505177。

進一步將與 NeLV-LY56 抗體產生正反應之不同寄主來源之病毒分離株，包括分離自火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙者，選殖其 3' 端約 1.5 kbp 大小之核酸片段定序，並分析對

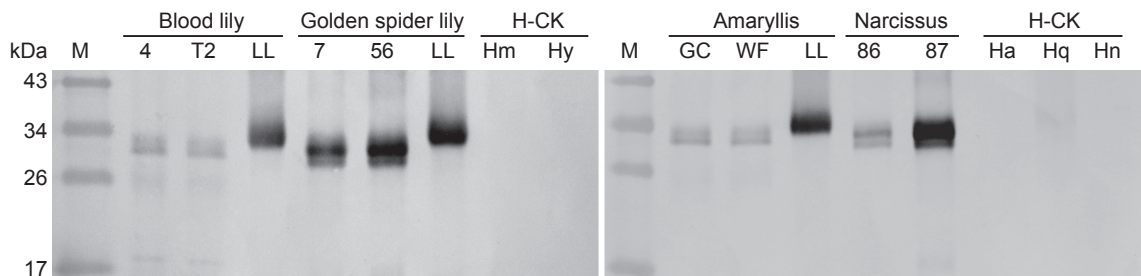


圖 1. 以西方墨點法及 *Nerine latent virus* (NeLV)-LY56 抗體檢測火球花及其他石蒜科花卉上之病毒發生。行 M：蛋白質分子量標幟；分別檢測火球花 (blood lily, 行 4 及 T2, 分別為 HM4 及 HM03T2)、金花石蒜 (golden spider lily, 行 7 及 56, 分別為 LY7 及 LY56)、孤挺花 (amaryllis, 行 GC 及 WF, 分別為 ALGC6 及 ALWF36)；行 LL, HM4、LY56 及 ALWF36 之奎藜單斑組織、水仙罹病組織 (narcissus, 行 86 及 87, 分別為 Nar86 及 Nar87)；健康組織 (H-CK) 包括火球花 (行 Hm)、金花石蒜 (Hy)、孤挺花 (Ha)、奎藜 (Hq) 及水仙 (Hn)。

Fig. 1. Western blotting for the detection of *Nerine latent virus* (NeLV)-infected tissues of *Amaryllidaceae* ornamental hosts, including blood lily, golden spider lily, amaryllis and narcissus, using the antiserum against NeLV-LY56. Lane M: protein marker; lanes 4 & T2, HM4 and HM03T2 isolates of diseased bloody lily; lanes 7 & 56, LY7 and LY56 isolates of diseased golden spider lily; lanes GC & WF, ALGC6 and ALWF36 isolates of diseased amaryllis; lanes 86 & 87, Nar86 and Nar87 isolates of diseased narcissus; lane LL, local lesions on *Chenopodium quinoa* generated by respective diseased host tissues of HM4, LY56, and ALWF36, respectively. Lanes Hm, Hy, Ha, Hq, and Hn, healthy control (H-CK) of blood lily, golden spider lily, amaryllis, *C. quinoa*, and narcissus, respectively.

應 CP 及 CRP 之核酸序列。證實其 CP 之核苷酸及胺基酸序列均與 NeLV (JQ395044) 達到 96–99% 之相同度 (表 1)，而與 CRP 核苷酸及胺基酸序列均達 97–100% 之相同度 (結果未出示)。此等不同分離株其 CP 序列之 GenBank 登錄序號，詳見表 1。

NeLV 分離株之類緣關係分析

分析比對本研究由火球花等 4 種石蒜科花卉所獲得之 NeLV 分離株之 CP 胺基酸序列顯示，所有火球花分離株之 CP 於 N 端起第 6 個胺基酸為 Asparagine (N)，異於其他分離株之 Lysine (K)，具有其獨特性 (圖 2)；此外所

表 1. 火球花 *Nerine latent virus* (NeLV) 分離株與其他已知 NeLV 病毒之核酸與胺基酸序列相同度比較。

Table 1. Comparison of the identities of nucleotide and amino acid sequences of the coat protein (CP) of *Nerine latent virus* (NeLV) isolated from blood lily with those of other known NeLV isolates available in GenBank.

Isolate ^z	Acc. no.	% identity of CP ^z	
		nt	aa
Marijiniup 5	JQ395044	100.0	100.0
HM4	KC505177	97.0	98.7
HM15	KC505178	96.4	98.3
HM94W6	KM396456	96.5	98.3
HM03W1	KM396457	96.7	98.7
HM03W2	KM396458	96.9	99.0
HM03T2	KM396459	97.0	99.0
HM03T5	KM396460	96.7	99.0
LY56	JX880023	98.5	99.3
LY39	JX913805	98.3	99.3
LY7	JX901048	98.3	99.3
LY9	JX978442	97.5	98.7
ALGC6	JX848395	97.9	98.0
ALWF36	JX848394	96.9	99.3
ALHL14	JX880024	97.1	98.0
Nar86	JX524884	98.9	99.0
Nar87	JX524885	98.9	99.0
Marijiniup 4	JQ395043	77.9	77.9
Hangzhou-2005	AM182569	98.2	99.3
IVT80054	HM119498	99.2	100.0
Ext07	HM119497	97.5	97.6
191191	HM119495	98.0	97.3
281299	HM119496	99.1	99.7
HLV	DQ098905	49.3	38.9
HLV	NC_011540	49.3	38.9
NCLV	AJ311375	52.1	38.3

^z Percent identities (%) of the respective nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences were analyzed by the Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Bethesda, MD). All of the nucleotides (nts) of NeLVs coding for coat protein and cycteine-rich protein are 891 and 405 nts, respectively.

^y The sequences of NeLV: Marijiniup 5 isolate was used for leader comparison. Isolates collected from blood lily were HM4, HM15, HM94W6, HM03W1, HM03W2, HM03T2, and HM03T5; from Golden spider lily were LY56, LY39, LY7, and LY9; from amaryllis were ALGC6, ALWF36, and ALHL14; from narcissus were Nar86 and Nar87 in this study. Two *Carlavirus* isolates of Hippeastrum latent virus (HLV) and one *Narcissus common latent virus* (NCLV) available in GenBank were used for comparison.

有的火球花分離株之第 13 個胺基酸均為 Asparagine (N)，此與其他分離株大多為 Serine (S) 也有所差異。唯一例外，是 2 個金花石蒜分離株 (LY39 & LY56) 及 1 個孤挺花分離株 (ALGC6)，在此位置下與火球花分離株同為有相同之 Asparagine (圖 2)，顯示 LY39、LY56 及 ALGC63 者與火球花分離株有較相近的類緣 (圖 3)。

此外，將分離自各種不同石蒜花卉之 NeLV 分離株，與可感染石蒜科並同為 *Carlavirus* 屬之 HLV 及 NCLV 為外群 (outgroups) 代表，進行類緣演化分析。其樹狀分析圖結果顯示，不同來源之 NeLV 分離株與 HLV 或 NCLV 呈現不同的分類群組；而群組相近之 NeLV 分離株中，火球花分離株自成一親近群組 (圖 3)；而孤挺花台灣分離株 (ALGC6、

ALWF36 及 ALHL14) 則分布於較相近之群組裡，但與國外之兩個孤挺花分離株 (191191 及 Marijiniup 4) 卻分布於不同之群組裡 (圖 3)。金花石蒜或水仙之分離株，其類緣分布較為分散 (圖 3)。

不同石蒜科花卉 NeLV 之 RT-PCR 核酸檢測：以本研究針對 NeLV 之 CP 序列所設計之專一性引子對 (NeLV552u/NeLV552d) 進行火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙之 NeLV 罹病組織或其奎藜單斑之 RT-PCR 檢測，於電泳分析結果顯示所有受測之罹病樣品均可被增幅出大小約 552 bp 之預估核酸片段 (圖 4)。

火球花等不同石蒜科花卉寄主發生 NeLV 之調查

2006–2014 年期間，本研究利用 NeLV-

Nar86	---MSTIGKTASPSGSDEERENTRKALDERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
Nar87	---MSTIGKTASPSGSDEERENTRKALDERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
LY7	---MSTIEKTASPSGSDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
Hangzhou5	---MSTIEKTASPSGSDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
Marijiniup5	---MSTIEKTASPSGSDEERENTRKALEERLKKRAEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
IVT80054	---MSTIEKTASPSGSDEERENTRKALEERLKKRAEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
281299	---MSTIEKTASPSGSDEERENTRKALEERLKKRAEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
HM4	---MSTIENTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
HM03W2	---MSTIENTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
HM03T5	---MSTIENTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
HM03T2	---MSTIENTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
HM03W1	---MSTIENTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
HM15	---MSTIENTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
HM94W6	---MSTIENTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
LY39	---MSTIEKTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
LY56	---MSTIEKTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
ALGC6	---MSTIEKTASPSGNDDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
ALWF36	---MSTIEKTASPSGGDEERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
ALHL14	---MSTIEKTASPSGTDEERENTRKLEERLKKRTEEAKKELTGNSDDELEERFRKLKE	57
LY9	---MSTIEKTASPSGSEVERENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
EXT07	---MSRMKETASPSGSDEEKENTRKALEERLKKRTEEANKEFTGNNSDDELEERFRKLKE	57
191191	---MSTMKKTASPSGSDEERENPGKALEERLKKRTEEANKEFTVNSDDELEERFRKLKE	57
Marijiniup4	---MSTSDKQVPPPEQENERNRKILEERLKKXAEETV IETGSGSDDALEERFRKLKE	57
NC_011540*	---MATKVADNPSDPNVGEPKATKPG-----DNVDPAAAADLFDDARLMEDQIEERMARLRE	54
DQ098905*	---MATKVADNPSDPNVGEPKATKPG-----DNVDPAAAADLFDDARLMEDQIEERMARLRE	54
AJ311375**	MSGTTGAESFPAPSQSEQRARDRAGASQKTENLRKHATAEGDTSDEEVSLERLNNLRE	60

圖 2. 不同 *Nerine latent virus* (NeLV) 分離株及兩種 carlaviruses 鞘蛋白之胺基酸序列比對圖。

Fig. 2. Alignment of the amino acid sequences of different *Nerine latent virus* (NeLV) isolates and two other carlaviruses. Fifty-seven amino acids (aas) in the N-terminal region of coat proteins of 23 NeLV isolates were compared. Isolates collected from blood lily were HM4, HM03W2, HM03T5, HM03T2, HM03W1, HM15, and HM94W6; from golden spider lily were LY39, LY56, LY9, and LY7; from amaryllis were ALGC6, ALWF36, and ALHL14; from narcissus were Nar86 and Nar87 in this study. The 6th and 13th aas of blood lily isolates were both Asparagines (N). Two isolates of *Hippeastrum latent virus* (*) and one *Narcissus common latent virus* (**) available in GenBank were used for comparison.

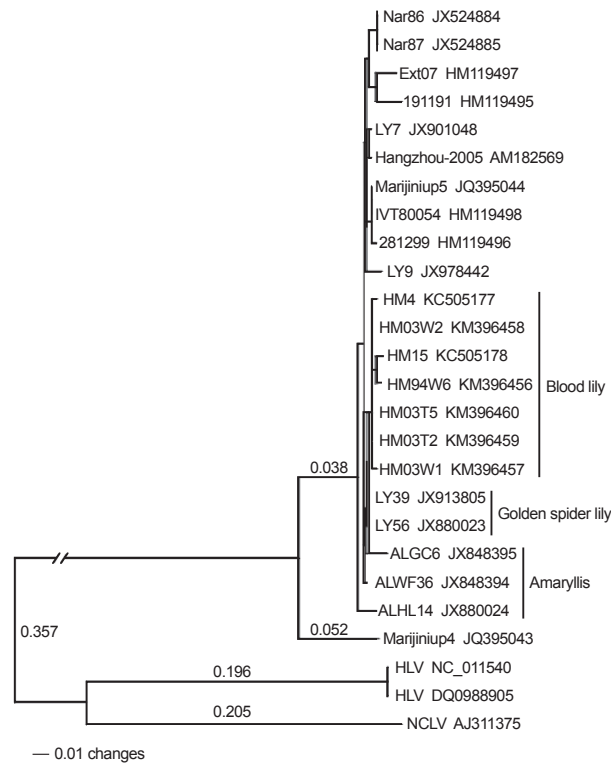


圖 3. 不同 *Nerine latent virus* (NeLV) 分離株及兩種 carlaviruses 之類緣分析。

Fig. 3. A phylogram derived from the analysis of genetic distances based on the amino acid sequences of the coat proteins of 23 isolates of *Nerine latent virus* (NeLV) and two carlavirus isolates. The tree was constructed using the neighbour-joining (NJ) algorithm with the bootstrap resampling method (1,000 random resamplings), using PAUP 4.0. Numbers at each node indicate the percentages of bootstrap samples. Horizontal branch length is drawn according to the scale bar indicating 5 substitutions per 1000 amino acid positions. Isolates collected from blood lily were HM4, HM15, HM94W6, HM03W1, HM03W2, HM03T2, and HM03T5; from golden spider lily were LY56, LY39, LY7, and LY9; from amaryllis were ALGC6, ALWF36, and ALHL14; from narcissus were Nar86 and Nar87 in this study. Sequences of *Hippeastrum latent virus* (HLV) and *Narcissus common latent virus* (NCLV) isolates were from GenBank and used as outgroup elements.

LY56 抗體以 indirect ELISA 法進行田間石蒜科花卉之 NeLV 發生調查。結果如表 1 所示，火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙之檢出率 [(檢出數/樣品數) × 100%] 分別為 18.4、32、79 及 13.3% (表 2)，顯見 NeLV 已普遍發生於多種石蒜科花卉中。

討論

本研究乃以血清學及核酸分子鑑定之結果，首次證明 NeLV 感染火球花。應用以往本研究室由金花石蒜所分離之 NeLV 分離株 (LY56, Acc. no. JX880023) 之抗血清 (Chen *et*

al. 2005)，證實可以於 indirect ELISA 及西方墨點法中，與火球花分離株 (HM4) 及其所接種繁殖之奎藜葉片局部斑點組織發生專一性反應。另外，進一步經由選殖與定序 HM4 分離株基因體核酸 3' 端約 1.5 kbp 大小之片段，發現與已知 NeLV 在鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列上有高達 97% 以上之相同度，顯見火球花 HM4 分離株乃屬 NeLV 之系統。本研究中，無病徵顯現之火球花葉片經機械接種於奎藜上可形成局部斑點病徵，但其單斑組織回接火球花時並未成功，其回接之方法尚待確認。然而由上述之相關鑑定結果，顯示 NeLV 確實存在於火球花上，此乃證明火球花為 NeLV 天然寄

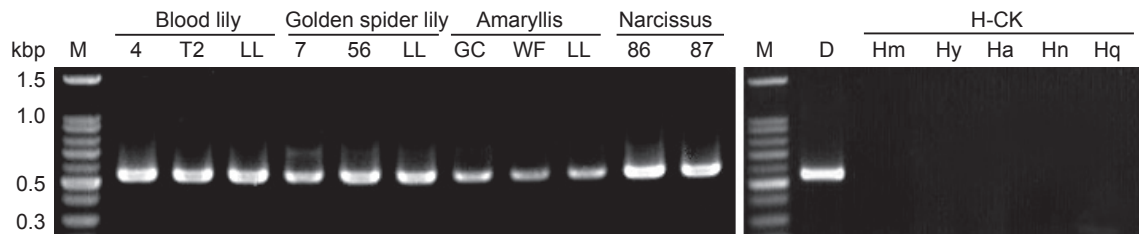


圖 4. 利用 NeLV552u/NeLV552d 引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應中檢測火球花及其他石蒜科花卉之 *Nerine latent virus*。行 M：核酸分子量標幟；分別檢測火球花 (blood lily, 行 4 及 T2, 分別為 HM4 及 HM03T2)、金花石蒜 (golden spider lily, 行 7 及 56, 分別為 LY7 及 LY56)、孤挺花 (amaryllis, 行 GC 及 WF, 分別為 ALGC6 及 ALWF36)；行 LL, HM4、LY56 及 ALWF36 之奎藜單斑組織；水仙罹病組織 (narcissus, 行 86 及 87, 分別為 Nar86 及 Nar87)；健康組織 (H-CK) 包括火球花 (行 Hm)、金花石蒜 (行 Hy)、孤挺花 (行 Ha)、水仙 (行 Hn) 及奎藜 (行 Hq)；行 D, 罹病火球花組織對照。預估增幅出之核酸片段為 552 bp。

Fig. 4. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of *Nerine latent virus* (NeLV)-infected tissues of *Amaryllidaceae* ornamental hosts including blood lily, golden spider lily, amaryllis and narcissus. Lane M: molecular marker; lanes 4 & T2, HM4 and HM03T2 isolates of diseased bloody lily; lanes 7 & 56, LY7 and LY56 isolates of diseased lycoris; lanes GC & WF, ALGC6 and ALWF36 isolates of diseased amaryllis; lanes 86 & 87, Nar86 and Nar87 isolates of diseased narcissus; lane LL, local lesions on *Chenopodium quinoa* generated by respective diseased host tissues of HM4, LY56, and ALWF36. Lanes Hm, Hy, Ha, Hn, and Hq, healthy control (H-CK) of blood lily, golden spider lily, amaryllis, narcissus and *C. quinoa*, respectively; lane D, diseased tissues of bloody lily. The predicted sizes of DNA fragments amplified from NeLV-infected tissue were 552 bp by NeLV552u/NeLV552d primer pair.

表 2. 以 indirect ELISA 檢測 *Nerine latent virus* 於火球花及不同石蒜科花卉之發生。

Table 2. Survey of the occurrences of *Nerine latent virus* on blood lily and other *Amaryllidaceae* ornamental hosts detected by indirect ELISA^z.

Host	Detection rate (%) ^y	No. samples	No. positive detected samples ^x
Blood lily (<i>Haemanthus multiflorus</i> Martyn)	18.4	49	9
Golden spider lily (<i>Lycoris aurea</i> Herb.)	32.0	106	34
Amaryllis (<i>Hippeastrum hybridum</i> Hort.)	79.0	115	91
Narcissus (<i>Narcissus</i> spp.)	13.3	45	6

^z Indirect ELISA was conducted using the antiserum against *Nerine latent virus* (NeLV)-LY56. Immunoglobulins of the tested antisera were diluted 1/1000 to react with antigens in a dilution of 1/30. The absorbance readings (A_{405nm}) were taken 40 min after addition of enzyme substrate solution. The absorbance values are an average of two replicate wells.

^y Detection rate (%) was determined by [(No. positive detected samples/No. total samples) × 100%].

^x Positive detected samples were determined by those ELISA reactivities higher than two times of the healthy control (A_{405nm}).

主之首次紀錄。筆者以往報告有關火球花之病毒病害尚包括有兩種可引起黃斑型病徵之病毒, CaCV (Chen *et al.* 2009) 及 CMV (Chen & Chiang 2015), 歷年之結果使得火球花之病毒病害發生種類更臻明確。

孤挺花 (Derks 1995) 及水仙 (Brunt 1995) 為文獻上已有報導之 NeLV 寄主, 金花石蒜可

被 NeLV 感染則為筆者等人以往所鑑定 (Chen *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005)。本研究中亦透過血清及分子生物學之鑑定, 證實孤挺花及水仙上亦可分離到 NeLV 之感染 (表 1、圖 1、圖 4)。加上 2006–2014 年期間所進行之田間不同石蒜科花卉之 NeLV 調查 (表 2), 更進一步印證以往學者報導 NeLV 於石蒜科花卉上已

普遍存在 (Derks & Maat 1995; Wylie & Jones 2012)，且於紀錄上單獨受此病毒感染之寄主並不出現病徵，本研究於火球花上也有相同之發現。

Nerine latent virus 為 *Carlavirus* 屬成員，*Carlavirus* 屬之鞘蛋白分子量範圍為 31–36 kDa (Tiberini *et al.* 2011)。本研究之火球花病毒分離株，依據其鞘蛋白胺基酸序列 (297 aa) 所估算之分子量約為 32.7 kDa，此與西方轉漬法於奎藜樣品所檢測到之蛋白條帶分子量相符，然而其原始寄主罹病組織所反應之蛋白主條帶分子量則略低於 32.7 kDa，且電泳分析中尚有其他分子量更低之蛋白條帶呈現。此種現象於金花石蒜及孤挺花樣品中也有類似之趨勢 (圖 1)，推測此可能與系統性感染組織中之病毒鞘蛋白遭到裂解有關 (Larsen *et al.* 1996)，且罹病組織在冷凍保存過程中會加速蛋白之裂解作用 (Hiebert & McDonald 1973)。反之，NeLV 之鞘蛋白可能於奎藜單斑組織上較為穩定，或推論其組織中有抑制蛋白裂解之成分存在，才會導致此種分子量差異但血清反應一致之結果。此種鞘蛋白裂解現象在過去文獻中其他 *Carlavirus* 屬病毒包括 *Kalanchoe latent virus* (Hearon 1984; Dinesen *et al.* 2009) 及 *Red clover vein mosaic virus* (Larsen *et al.* 1996) 及 *Potyvirus* 屬病毒如 *Turnip mosaic virus* (TuMV) (Hiebert & McDonald 1973) 均有相同之描述。筆者等人在具感染力之 TuMV 載體系統 (infectious TuMV vector) 研究中，亦曾發現 TuMV 及其所攜帶之外源螢光蛋白 (GFP) 在奎藜單斑上較為穩定，而在系統性寄主上則較易被裂解之情形 (Chen *et al.* 2007)。

在分子層次上，依據 ICTV (The International Committee on Taxonomy of Viruses) 最新的分類標準，*Carlavirus* 屬病毒若其鞘蛋白之核苷酸及胺基酸序列相同度分別低於 72% 及 80% 時，則視為不同之種類 (species) (King *et al.* 2012)。本研究由火球花上所分離之 7 個分離株，均與已知 NeLV (JQ395044) 於鞘蛋白胺基酸序列上有高於 98% 之相同度，因此分類上視為同種病毒應無疑義。此外，由台灣學者於 2005 年登錄在 GenBank 上之孤挺

花潛隱病毒 (*Hippeastrum latent virus*; HLV) (Accession no. DQ098905 及 NC_011540) 原被 ICTV 歸類為 NeLV 之系統 (King *et al.* 2012)，然而本研究比對發現 HLV 與 NeLV 間於鞘蛋白基因之核苷酸與胺基酸序列分別只有 49.3% 及 38.9% 之相同度 (表 1)，故二者顯然應視為同屬 *Carlavirus* 之不同種病毒，而非同種病毒之不同系統。Wylie & Jones (2012) 由其研究之不同 *Carlavirus* 核酸序列分子比對結果，亦表示 HLV 與 NeLV 應屬不同種 *Carlavirus* 病毒。因此有關 HLV 分類地位之釐清，應請 ICTV 重新予以認定。

在類緣分析上，由 CP 胺基酸序列比對 (alignment) 結果顯示，火球花 NeLV 病毒分離株於 CP 之 N 端第 6 個胺基酸具有其獨特性為 Asparagine (N)，乃異於其他 NeLV 分離株者；於第 13 個胺基酸，亦均為 Asparagine (N)，與其他分離株大多為 Serine (S) 有所差異，此等現象顯示出火球花分離株之獨特性，推論與其自成一類緣群組有關，未來需有更多火球花分離株之分析，可更印證此獨特性。目前所採集之火球花分離株自成 1 個類緣分群；而孤挺花台灣分離株 (ALGC6、ALWF36 及 ALHL14) 分布於較相近之群組裡，與國外之兩個孤挺花分離株 (191191 & Marijiniup 4) 為不同之分群裡 (圖 3)；金花石蒜之分離株，其類緣分布較為分散。目前有關 NeLV 不同分離株之核酸序列逐漸被報導與發表，未來需要更多不同來源分離株之加入，以更釐清 NeLV 之類緣演化關係，包括不同寄主來源、地區及國家等因素之影響。

火球花目前常做為庭園花卉，可宿根栽植，有少量種球自國外進口。本研究針對火球花等不同石蒜花卉進行 NeLV 發生調查，其中迄至 2014 年於火球花之調查發現，此病毒於 2006 年首次被發現起持續發生於火球花上，而植株受單獨感染者均不顯現病徵，須經由檢測後方能確知。不同寄主來源之 NeLV 分離株，近年來已因核酸定序結果之釐清，並登錄於 GenBank 上可供比對而使得 NeLV 之核酸分子鑑定方式更加明確而有依據。

受 NeLV 單獨感染之石蒜花卉植株無病徵

表現，本研究另發現經由 indirect ELISA 未檢出此病毒反應之孤挺花樣品，於 RT-PCR 檢測中可檢出 NeLV 之核酸片段（結果未出示），顯示 RT-PCR 檢測可提升對 NeLV 之檢出效果，本研究開發之 RT-PCR 核酸檢測用引子對並已實際應用於進口火球花、金花石蒜、孤挺花或水仙種球之 NeLV 病毒檢定監測，以使進口種球之病毒檢測更臻完整，確保種球之健康。未來在此等石蒜科花卉種球之繁殖系統上，可實務地應用於無 NeLV 健康種苗生產之需。

引用文獻

- Blake, M. S., K. H. Johnston, G. I. Russell-Jones, and E. C. Gotschlich. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136:175–179.
- Bratney, C., J. L. Badge, R. Burns, G. D. Foster, and E. George. 2002. Potato latent virus: A proposed new species in the genus *Carlavirus*. *Plant Pathol.* 51:495–505.
- Brolman-Hupkes, J. E. 1975. Tentative description of Hippeastrum latent virus in *Hippeastrum hybridum* plants and differentiation from *Hippeastrum mosaic virus*. *Neth. J. Plant Pathol.* 81:226–236.
- Brunt, A. A. 1995. Narcissus viruses. p.322–334. *in: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops.* (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) Wiley. Chichester, UK. 556 pp.
- Chang, C. A., D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1988. Characterization and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyviruses. *Phytopathology* 78:1266–1275.
- Chen, C. C., C. H. Huang, Y. H. Cheng, T. C. Chen, S. D. Yeh, and C. A. Chang. 2009. First report of *Capsicum chlorosis virus* infecting amaryllis and blood lily in Taiwan. *Plant Dis.* 93:1346–1346.
- Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2015. Identification and detection of *Cucumber mosaic virus* isolated from blood lily (*Haemanthus multiflorus*). *J. Taiwan Agric. Res.* 64:74–79. (in Chinese with English abstract)
- Chen, C. C., F. L. Chiang, Y. H. Cheng, Y. M. Chang, Y. Y. Lin, and C. A. Chang. 2005. *Lycoris virus* T, a carlavirus newly identified in golden spider lily also found widespread in narcissus and amaryllis. *Plant Pathol. Bull.* 14:300.
- Chen, C. C., T. C. Chen, J. A. J. Raja, C. A. Chang, L. W. Chen, S. S. Lin, and S. D. Yeh. 2007. Effectiveness and stability of heterologous proteins expressed in plants by *Turnip mosaic virus* vector at five different insertion sites. *Virus Res.* 130:210–227.
- Chen, C. C., Y. L. Jhang, B. Y. Lin, F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2013. Serological reagent preparation and improvement of serological method to detect the *Plantago asiatica mosaic virus* in lily. *J. Taiwan Agric. Res.* 62:268–279. (in Chinese with English abstract)
- Chen, C. C., Y. Y. Lin, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2004. Serological and molecular characterization of a distinct carlavirus infecting golden spider lily. *Plant Pathol. Bull.* 3:354. (in Chinese with English abstract)
- Chen, J., Y. H. Shi, Y. W. Lu, M. J. Adams, and J. P. Chen. 2006. Narcissus symptomless virus: A new carlavirus of daffodils. *Arch. Virol.* 151:2261–2267.
- Derks, A. F. L. M. 1995. Hippeastrum viruses. p.293–297. *in: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops.* (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) Wiley. Chichester, UK. 556 pp.
- Derks, A. F. L. M. and D. Z. Maat. 1995. Nerine. p.335–340. *in: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops.* (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) Wiley. Chichester, UK. 556 pp.
- Dinesen, M., M. Lundmark, and M. Albrechtsen. 2009. Complete genome sequences of two isolates of *Kalanchoe latent virus*. *Arch. Virol.* 154:1173–1175.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Hakkaart, F. A., D. Z. Maat, and F. Quak. 1975. Viruses and meristem culture of Nerine. *Acta. Hort.* 47:51–53.
- Hearon, S. S. 1984. Comparison of two strains of *Kalanchoe latent virus*, Carlavirus group. *Phytopathology* 74:670–676.
- Hiebert, E. and J. G. McDonald. 1973. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. *Virology* 56:349–361.
- Jayasinghe, U. and J. Dijkstra. 1979. *Hippeastrum mosaic virus* and another filamentous virus in *Eucharis grandiflora*. *Neth. J. Plant Pathol.* 85:47–65.
- King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz. 2012. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: An Elsevier Title.* Elsevier Academic Press. San Diego. 1327 pp.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227:680–685.

- Larsen, R. C., W. J. Kaiser, and S. D. Wyatt. 1996. First report of a virus disease of chickpea caused by a strain of Red clover vein mosaic carlavirus. *Plant Dis.* 80:709.
- Maat, D. Z., H. Huttinga, and F. A. Hakkaart. 1978. *Nerine latent virus*, some properties and serological detectability in *Nerine bowdenii*. *Neth. J. Plant Pathol.* 84:47–59.
- MacKinnon, J. 1974. Detection, spread, and aphid transmission of potato virus S. *Can. J. Bot.* 52:461–465.
- Page, R. D. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computer. *Comput. Appl. Biosci.* 12:357–358.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony), Version 4. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 143 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.
- Tiberini, A., T. Mascia, and L. Tomassoli. 2011. First nucleotide sequence of a Carlavirus virus genus infecting caper. *Phytopathol. Mediterr.* 50:482–488.
- 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.
- Wylie, S. J. and M. G. K. Jones. 2012. Complete genome sequences of seven carlavirus and potyvirus isolates from *Narcissus* and *Hippeastrum* plants in Australia, and proposals to clarify their naming. *Arch. Virol.* 157:1471–1480.

Serological and Molecular Identification of *Nerine latent virus* Infecting Blood Lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn)

Chin-Chih Chen^{1*}, Chin-An Chang^{2*}, and Fen-Lang Chiang³

Abstract

Chen, C. C., C. A. Chang, and F. L. Chiang. 2016. Serological and molecular identification of *Nerine latent virus* infecting blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn). *J. Taiwan Agric. Res.* 65(2):194–206.

A virus isolate (HM4), obtained from a symptomless blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn) plant, was established on *Chenopodium quinoa* Willd. by three successive single lesion re-isolation and inoculation. The original blood lily plant and inoculated *C. quinoa* leaf tissues of HM4 were reacted strongly with the antibody against the LY56 isolate of *Nerine latent virus* (NeLV) from golden spider lily in indirect ELISA and western blotting. A 1.5-kbp DNA fragment was amplified by RT-PCR from HM4-infected blood lily and *C. quinoa* tissues using a primer pair specific to the 3'-end of genomic sequences of NeLV. Sequence analyses revealed that the amplicon comprises 1,560 nucleotides spanning the entire open reading frame of coat protein (CP) and the complete cysteine-rich protein region of NeLV. Comparison of nucleotide and amino acid sequences indicated that the CP of HM4 shares 96–99% identities with those of the other six blood lily isolates and the known NeLV isolates documented in the GenBank. Results indicated that HM4 and the other six blood lily isolates are the isolates of NeLV. In phylogenetic analysis, these blood lily isolates and those NeLVs from golden spider lily (*Lycoris aurea*), amaryllis (*Hippeastrum hybridum* Hort.) and narcissus (*Narcissus* spp.) were grouped in the same clade evidently differing from that of *Hippeastrum latent virus* (HLV) and *Narcissus common latent virus* (NCLV). Phylogenetic analysis indicated that the blood lily isolates are grouped in the same sub-clade. Our studies also confirmed that all the NeLV isolates from blood lily, golden spider lily, amaryllis and narcissus can be detected by the same antiserum against NeLV-LY56 in indirect ELISA and western blotting. Moreover, a 552-bp DNA fragment can be amplified from all these NeLV isolates in RT-PCR using the primers designed from the genomic sequence of HM4. Field surveys were conducted during 2006–2014 by indirect ELISA and showed 18.4, 32, 79, and 13.3% of the incidences of NeLV in blood lilies, golden spider lilies, amaryllis and narcissus, respectively, in Taiwan. Based on the serological and molecular evidences, NeLV naturally infecting blood lilies without showing discernible symptoms is first reported.

Key words: Blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn), *Nerine latent virus* (NeLV), Serological detection, RT-PCR detection, Phylogenetic analysis.

Received: July 29, 2015; Accepted: October 5, 2015.

* Corresponding authors, e-mail: chinzue@tari.gov.tw; cachang@cyut.edu.tw

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

² Professor, Department of Applied Chemistry, Chaoyang University of Technology, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.