

玉米褪綠斑駁病毒 (*Maize chlorotic mottle virus*) 之 親緣分析與台灣之發生調查

王建銘¹ 陳君弢² 簡伊萱³ 蔡錦慧³ 陳金枝¹ 林鳳琪⁴ 陳怡如⁵ 鄧汀欽^{6*}

摘要

王建銘、陳君弢、簡伊萱、蔡錦慧、陳金枝、林鳳琪、陳怡如、鄧汀欽。2018。玉米褪綠斑駁病毒 (*Maize chlorotic mottle virus*) 之親緣分析與台灣之發生調查。台灣農業研究 67(2):191–208。

自雲林縣虎尾地區採集具褪綠、黃化及褐化乾枯病徵之玉米病害樣本，並將其機械接種於甜玉米 'Honey-236' 可產生類似褪綠斑駁病徵，並獲得一個分離株 (稱為 NFU2)。樣本以簡併式引子對進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR)，可增幅出預期大小 (1.4 kb) 產物，經解序後序列與玉米褪綠斑駁病毒 (*Maize chlorotic mottle virus*; MCMV) 中國 Yunnan3 分離株 (Acc. No. JQ982469) 相同度達 99%。將 MCMV NFU2 分離株全基因體解序後，其全長為 4,436 nt，經親緣分析後 MCMV 共可分為美國分離株、中國分離株、東非分離株及台灣分離株等四個分群；若將其鞘蛋白序列進行親緣分析，則可發現泰國之 MCMV 分離株應為近年於亞非大發生 MCMV 之共同起源。依解序所得 MCMV NFU2 分離株之鞘蛋白序列，構築於表現載體後大量表現以製備其多元抗血清，該多元抗血清經測試可用於田間樣本之酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 檢測。此外，利用其鞘蛋白序列設計專一性引子對 MCMV-g3514F/MCMV-g4014R，可以 RT-PCR 於單隻玉米薊馬中檢測出 MCMV，可作為後續媒介昆蟲傳播 MCMV 的機制研究之用。於 2014–2015 年間利用 MCMV 及甘蔗嵌紋病毒 (*Sugarcane mosaic virus*; SCMV) 抗體於台灣各地玉米栽培區調查，共檢測 306 個樣本，結果顯示 MCMV 罹病率達 79.7%，MCMV 與 SCMV 複合感染造成之玉米致死性壞疽 (maize lethal necrosis; MLN) 罹病率為 31.7%；檢測樣本中，白玉米、糯玉米、青割玉米、硬質玉米及 7 種甜玉米品種皆可檢出 MCMV，食用玉米中「華珍」之罹病率較低，但亦達 60%，青割玉米及硬質玉米 MCMV 罹病率平均達 31.6%。本研究為台灣 MCMV 分離株之基因體全長度解序、親緣分析、檢測試劑開發及病害調查之首次報告。

關鍵詞：玉米褪綠斑駁病毒、甘蔗嵌紋病毒、親緣分析、檢測試劑、病害調查。

前言

玉米 (*Zea mays* L.) 為禾本科玉米屬的一年生草本作物，原產於中美洲墨西哥，是目前世界上產量最大的糧食及飼料作物。台灣的玉米栽

培始紀錄於 1717 年，依據農業統計年報資料顯示，1988 年台灣玉米栽培面積高達 82,183 ha，之後逐漸減少，至 2012 年硬質玉米及食用玉米栽培面積共僅 16,651 ha；近幾年來硬質玉米栽培面積明顯增加，2015 年度達 15,135 ha，食用

投稿日期：2017 年 5 月 22 日；接受日期：2017 年 10 月 23 日。

* 通訊作者：tcde@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 農委會動植物防疫檢疫局新竹分局技士。台灣 桃園市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。

⁵ 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。

⁶ 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

玉米栽培面積也增加至 12,616 ha。往年台灣玉米病毒病害僅有玉米矮化嵌紋病毒 B 型系統 (*Maize dwarf mosaic virus* B strain; MDMV-B)，現在分類屬於甘蔗嵌紋病毒 (*Sugarcane mosaic virus*; SCMV) 的 SCMV-MDB strain (Deng 1985; Deng *et al.* 2014b) 及玉米條紋病毒 (*Maize stripe virus*; MSpV) (Chao *et al.* 1988) 的發生紀錄，兩者皆於栽培面積大增時被發現。由於栽培習慣改變，現今田間雖偶有發生，但並未有大面積感染情形。近年來玉米栽培面積再度明顯增加，新發生的玉米褪綠斑駁病毒 (*Maize chlorotic mottle virus*; MCMV) (Deng *et al.* 2014a; Chou *et al.* 2015) 造成大面積的玉米被感染，使產量及品質嚴重下降。

MCMV 是 *Tombusviridae* 科 *Machlomovirus* 屬唯一的一個種 (Scheets 2002)，MCMV 感染玉米引起之病徵主要為葉脈有平行條紋斑駁、葉片褪綠且全葉會有不同程度之黃化情形，嚴重時斑駁病徵癒合產生大面積之褪綠斑，植株可能矮化畸形，亦可能造成雄花穗節間縮短；若於成株時感染，則矮化情形不明顯，但雄花穗抽穗後，雄花穗及苞穗會有褐化乾枯情形、苞葉上亦可見有斑駁病徵。受害植株結穗充實率不佳，越早期感染，充實率越差 (Uyemoto 1983)。此病毒於 1974 年在南美洲秘魯玉米栽培區被首次發現 (Castillo & Hebert 1974)，爾後十年間於美洲地區，如美國、墨西哥、巴西、阿根廷等地玉米栽培區陸續有 MCMV 的發現報導 (Niblett & Claflin 1978; Teyssandier *et al.* 1982; Uyemoto 1983; Delgadillo Sanchez & Gaytan Beltran 1987)，1990 年於夏威夷地區首次發現 MCMV 危害，並嚴重影響當地玉米產業，亦凸顯了 MCMV 經種子長距離傳播的可能性 (Jensen *et al.* 1991)。亞洲地區的 MCMV 最早發生於泰國，但危害範圍較為侷限 (Klinkong & Sutabutra 1982)；直至 2009 年，中國雲南省亦首次發現 MCMV，並於 2011 年正式報導 (Xie *et al.* 2011)。隨後陸續在中國四川省、台灣、肯亞、盧安達、衣索比亞、剛果民主共和國、坦尚尼亞等國家廣泛被報導且嚴重發生 (Xie *et al.* 2011; Wangai *et al.* 2012; Adams *et al.* 2014; Deng *et al.* 2014a; Lukanda *et al.* 2014; Mahuku *et al.* 2015b;

Fentahun *et al.* 2017)，2016 年於南美洲厄瓜多爾亦有 MCMV 的首次報導 (Quito-Avila *et al.* 2016)。

MCMV 能夠快速擴散且成為玉米生產的限制因子的主要原因是：(1) 具種子傳毒能力可行長距離傳播，雖其種傳能力極低，約僅 0.04% (Jensen *et al.* 1991)，但 Mahuku *et al.* (2015a) 以反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR) 方式檢測從 MCMV 感染玉米植株採收之種子，其種子帶毒率約 72%，且在非洲當地購買的玉米種子即可檢測到 MCMV。自 2010 年開始，中國陸續於美國、德國進口玉米種子中測得 MCMV，其傳毒率分別為 0.33%、0.5%，而於泰國進口玉米種子可測得種子帶毒率為 2% (Gong *et al.* 2010; Liu *et al.* 2011; Lei *et al.* 2013)；MCMV 藉由種子傳毒，將可迅速傳播至新發生地區或其他國家。(2) 媒介昆蟲種類多樣且可迅速傳播 MCMV 於鄰近栽培區，目前已知包含多種鞘翅目金花蟲科 (*Chrysomelidae*) 甲蟲可以永續型方式傳播 MCMV (Nault *et al.* 1978) 及玉米薊馬 (*Frankliniella williamsi* Hood) (Jiang *et al.* 1992; Cabanas *et al.* 2013)、西方花薊馬 [*F. occidentalis* (Pergande)] (Zhao *et al.* 2014) 等 2 種薊馬以半持續型方式傳播 MCMV。Mahuku *et al.* (2015a) 的報告顯示，梳缺花薊馬 (*F. schultzei* Trybom)、蔥薊馬 [*Thrips tabaci* (Linderman)] 也可傳播 MCMV；在合適的環境下，媒介昆蟲可迅速增長繁殖並造成 MCMV 的大面積發生。(3) MCMV 可與 SCMV 等 potyviruses 複合感染造成玉米致死性壞疽 (maize lethal necrosis; MLN 或稱 corn lethal necrosis; CLN)，玉米遭 MLN 危害，其 MCMV 的病毒量較 MCMV 單獨感染植株上升 1.7 至 11.2 倍，MLN 危害植株較 MCMV 單獨感染者葉綠素含量下降約 5 倍 (Goldberg & Brakke 1987; Scheets 1998)。在外觀上，MLN 感染更容易造成嚴重黃化的病徵，並發展成葉緣及葉尖乾枯情形，且可造成 90% 以上的產量損失，苗期感染會造成矮化且絕收之情形 (Niblett & Claflin 1978; Uyemoto 1983)。自 2011 年以來玉米病毒病害嚴重發生地區，皆有大面積的 MLN 發生紀錄 (Xie *et al.* 2011; Wangai *et al.* 2012;

Adams *et al.* 2014; Deng *et al.* 2014a; Mahuku *et al.* 2015a; Mahuku *et al.* 2015b; Quito-Avila *et al.* 2016)。

MCMV 病毒在台灣自 2014 年首次報導後，目前仍缺乏台灣分離株的病毒親源分析，相關的病毒檢測工具亦待開發，而 MCMV 病毒在台灣的危害流行及生態學等相關資料仍需進一步研究。本研究針對在台灣發生之 MCMV 分離株之全長度序列解序，分析其與近年來各地區大發生之 MCMV 病毒之相關性，同時亦依據病毒鞘蛋白序列分析病毒親緣關係，並依鞘蛋白序列設計表現載體開發免疫血清檢測試劑，利用鞘蛋白核酸序列設計開發分子檢測引子，供後續相關研究使用。本研究亦藉由市售免疫檢測試劑，以及自行開發之免疫檢測血清，調查台灣 MCMV 病毒及其複合 SCMV 病毒發生情形，初步掌握 MCMV 病毒在台灣發生之現況。

材料與方法

病毒分離及發生調查

2014 年 2 月自雲林縣虎尾鎮採集呈現褪綠、斑駁及黃化病徵之疑似病毒病為害之玉米樣本，部分葉片周圍呈現壞疽情形。將樣本採回後取部分病葉進行機械接種以分離病毒 (Deng 1985)。取其葉片，以 1 : 10 (W : V) 比例之病組織汁液與磷酸緩衝液 (0.01 M KHPO₄, pH 7.0) 於研磨袋混合後進行研磨，研磨後粗汁液接種於灑有些許 400 目金鋼砂之甜玉米 (*Zea mays* var. *rugosa* cv. 'Honey-236') 葉片，出現斑駁病徵之玉米植株葉片以 10× 系列稀釋接種於甜玉米 'Honey-236'，每個稀釋濃度接種 10 棵甜玉米，接種後觀察其發病比例。

分離病毒時以 500× 磷酸緩衝液與接種發病株之葉片混合後研磨，研磨後粗汁液接種於甜玉米 'Honey-236'，待其出現病徵後重複上述稀釋及接種條件。反覆接種 3 次，之後獲得之病毒視為一分離株。為製備接種源，將單一分離株接種於超甜玉米 'Honey-236' 於植株成長至第 10 葉後，將其葉片切碎至 0.04 cm² 大小後放置於含無水氯化鈣 (CaCl₂) 之培養皿內，於 4°C 乾燥組織，至組織完全乾燥後置於含無水氯化鈣

之 15 mL 塑膠試管內備用。

為調查 MCMV 於台灣發生情形，針對雲林縣、嘉義縣、台南市、高雄市、花蓮縣及台東縣、苗栗縣及彰化縣等各地玉米栽培區進行調查，採樣時取明顯有黃化、褪綠病徵葉片或上位葉進行檢測。於雲林縣採集時，將玉米田區內帶有薊馬之植株帶回並鑑定薊馬種類。

RNA 抽取及反轉錄聚合酶鏈鎖反應

將 0.1 g 疑似病毒病為害玉米葉片樣本，以液態氮研磨葉片成粉狀後，以小量全 RNA 純化試劑組 (total RNA extraction kit/Mini, VioGene-Biotek Corp., New Taipei City, Taiwan) 進行病組織 RNA 萃取。以獲得之病組織全 RNA 作為模板，進行 RT-PCR。分別取 3 對簡併式引子對，包括 *Potyvirus* 屬病毒簡併式引子對 Hrp5/Pot1 (Pappu *et al.* 1993)、*Potexvirus* 屬病毒簡併式引子對 Potex1RC/Potex5 (van der Vlugt & Berendsen 2002) 及自行設計之 *Tenuivirus* 屬病毒簡併式引子對 Tenui-DF1/Tenui-DR1 與病組織全 RNA 進行 cDNA 合成，條件如下：病組織全 RNA 2–4 μL、2.5 mM dNTP 1 μL、10 μM 簡併式引子正反股各 1 μL，加入 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 處理的水至 12 μL。於 65°C 條件下 5 min，再於冰上靜置 1 min 以上，然後加入下述試藥：0.1 M DTT 2 μL、RNase OUT 1 μL、5× first strand buffer 4 μL，於 42°C 條件下靜置 2 min。其後，加入 Super script™ II (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) (200 units μL⁻¹) 1 μL，於 42°C 條件作用 50 min 以合成 cDNA，然後於 70°C 條件下作用 15 min 以去除酵素活性。獲得 cDNA 後，分別使用相應之簡併式引子對進行 touchdown polymerase chain reaction (PCR)，PCR 反應組成如下：Taq DNA polymerase 2× master mix with red (Ampliqon) 10 μL，簡併式正反股引子各 1 μL，cDNA 2 μL，補水至 20 μL。touchdown PCR 條件為 94°C 5 min (94°C 30 s, 50°C 溫度遞減至 43°C 30 s, 72°C 2 min) 進行 35 個循環，72°C 10 min 後靜置於 4°C。

為了檢測玉米薊馬之玉米褪綠斑駁病毒帶毒情形，使用 Genefisher2 (Giegerich *et al.* 1996) (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/>)

genefisher2/) 線上 PCR 引子對設計程式，依照不同 MCMV 病毒分離株 (Yunnan11, Acc. No. KF010583; Yunnan2, Acc. No. JQ982468; Sichuan, Acc. No. JQ982470; Yunnan3, Acc. No. JQ982469; Kenya, Acc. No. JX286709; Kansas, Acc. No. NC_003627; Nebraska, Acc. No. EU358605) 鞘蛋白保守性區域序列設計出引子對 MCMV-g3514F/MCMV-g4014R 作為 MCMV 病毒專一性 RT-PCR 檢測用，檢測時使用 Accupower® RT-PCR PreMix (Bioneer Corp., Seoul, Korea) 試劑組，RT-PCR 反應條件如下：試管內加入 RNA 1–4 μL 及 10 μM 正反股引子各 1 μL ，置於 70°C 5 min 後，置於冰上，之後將其與試劑組 Premix 混合並補 DEPC 水至 20 μL 。混合後，於 42°C 條件作用 1 h 以合成 cDNA。然後於 94°C 條件下作用 5 min 以去除酵素活性，之後進行 PCR 反應。先進行 94°C 5 min (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s) 進行 35 個循環，72°C 10 min 後靜置於 4°C。將 RT-PCR 後產物以 1.5% 洋菜膠，在 0.5 \times TAE，50 V 條件下進行電泳，最後以 EtBr 染色 10 min 後，以清水退染，並以 Vilber Lourmat 照膠系統搭配 Infinity Capt. 軟體 (version 14.2, Vilber Lourmat, Marne la Vallee, France) 拍照及分析。

病毒表現載體製作與抗血清製備

利用 pET28b (+) 表現載體系統以製備 MCMV 病毒抗血清，依據定序所得 MCMV 鞘蛋白 (Coat protein; CP) 全長序列，於鞘蛋白序列 5' 端及 3' 端分別設計引子對 (NdeI-MCMVCP-F/MCMVCP-Sall-R) 以增加鞘蛋白序列之 5' 端 NdeI 切位及 3' 端 Sall 切位。將增幅之具載體切位之鞘蛋白序列產物，依照 T&ATM cloning kit (Yeastern Biotech Co. Ltd., New Taipei City, Taiwan) 的操作步驟插入 T&A 載體獲得 pMCMVCP 載體，並次選殖於 pET28b (+) 載體後轉型入 *Escherichia coli* strain Rosetta™ (DE3) 勝任細胞 (Novagen, Inc., Madison, WI, USA)。

將具 MCMV 鞘蛋白表現載體之 *E. coli* strain Rosetta™ (DE3) 培養於 M9 培養液 (Li *et al.* 1998)，並以 1 mg mL⁻¹ 之異丙基- β -D- 硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside; IPTG) 誘導表現病毒鞘蛋白 (Chen *et al.* 2002)。取 15 μL MCMV 鞘蛋白表現蛋白及 MCMV 感染病

組織、健康組織及未轉型之 Rosetta *E. coli* 細胞於 150 V 進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 分析約 80 min 後，以 Coomassie Brilliant Blue 染色觀察結果。為確認 MCMV 鞘蛋白大小，且分析其有無會造成偽陰性蛋白混雜其中，再將未染色之 SDS-PAGE 與外購之 MCMV 免疫球蛋白 G (immunoglobulin G; IgG) 進行西方墨點轉漬法確認。後續將具 MCMV 鞘蛋白表現載體之 Rosetta *E. coli* 大量培養後，重複上述步驟取得大量表現之 MCMV 鞘蛋白，測量 A_{280nm} 吸光值並換算得到 1 mg mL⁻¹ 濃度之蛋白質濃縮液。將獲得之濃縮 MCMV 鞘蛋白溶液，委託全盟生技公司免疫注射白兔並收集其抗血清。

間接法酵素連結免疫分析 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 及種子群體測試

運用上述 MCMV 鞘蛋白之表現蛋白製備之抗血清，將抗血清依循 Clark & Adams (1977) 發表之方法純化 IgG 後，以專一性對應 MCMV 及外購之 MCMV IgG 進行 indirect ELISA 分析，所採用之 indirect ELISA 實驗步驟如前人所述 (Clark & Adams 1977; Lommel *et al.* 1982)；自製之 SCMV 抗血清 (Deng & Huang 1986)，以同樣方法純化 IgG 後進行 indirect ELISA 分析。

為檢測農民所使用種子是否有帶毒，採用 Chiang *et al.* (2007) 所發表之種子群體測試方法，將每包種子混勻後分為 1、3、5、10 粒種子各取樣 10 個樣本，100 粒種子取樣 5 個樣本，並置於研磨袋以榔頭敲碎等比例 (每粒種子加入 1 mL 清水) 研磨，並將之混勻後進行 indirect ELISA 分析。檢測結果依照 “Seed health” 方程式輸入 R 軟體 (R Core Team 2013) 後，可得出 MCMV 的種子帶毒率及信心範圍。

dsRNA 萃取及病毒全長序列選殖及分析

萃取 MCMV dsRNA 步驟修改自 (Valverde *et al.* 1986)，首先將 15 g MCMV 感染之玉米葉片凍於 -80°C 冷凍櫃後取出，並於預冷之研鉢配合液態氮磨碎成粉末，將磨碎病組織粉末倒入含 dsRNA 萃取緩衝液 (包含 45 mL 2 \times STE 緩衝

液 [0.1 M NaCl、0.02 M Tris-HCl (pH7.5)、0.01 M EDTA]、20 mL 10 % SDS、0.1 mL NH₄OH、0.8 mL 預冷之 4 % 膨潤土、1 mL 2-β-mercaptoethanol) 的離心管內。手搖 3–5 min 後，加入 25 mL 飽和苯酚 (pH 6.8) 至離心管內。手搖 3–5 min 後，再加入 25 mL 氯仿，之後置於混合器上室溫搖晃 45 min。之後以 8,000× g 離心 15 min，取上清液置入新離心管內，以 1× STE 緩衝液稀釋至 100 mL，並加入 100% 酒精直至酒精濃度為 17%，再加入 2 g CF-11 纖維素粉於離心管內。於混合器上常溫搖晃 45 min，之後將此纖維素混合溶液緩慢倒入管柱內，等 CF-11 纖維素粉沉澱後，將溶液析出。再沿管壁緩慢加入含 16.5% 酒精之 STE 緩衝液，亦等 CF-11 纖維素粉沉澱後，將溶液析出。當管柱內溶液到達纖維素粉液面時，加入 10 mL 1× STE 緩衝液，並以 30 mL 離心管收集析出液。將此析出液加入 20–25 mL 100 % 酒精及 0.1× 體積之 3 M NaOAC (pH 5.2) 後混勻，置於 -80°C 1 h，再以 12,000× g 離心 30 min 後，加入 200–400 μL 的 1× STE 緩衝液，將沉澱物重新懸浮。之後以 10,000× g 離心 5 min，以去除纖維素粉，收集上清液並加入 2.5× 體積 100% 酒精及 0.1× 體積之 3 M NaOAC (pH 5.2) 混勻，置於 -80°C 2 h，之後以 12,000× g 於 4°C 條件下離心 15 min；為去除鹽類，再加入 2.5× 體積之 80% 酒精，並以 6,000× g 離心 3 min。將上清液去除並留下沉澱物後，置於 60°C 烘箱烘乾，最後以 20 μL DEPC 處理的水回溶。

將獲得之 dsRNA 以 poly(A) tailing kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 進行多聚腺苷酸化 (polyadenylation)，方法依照其說明書進行。將適量的 dsRNA 與 DEPC 處理的水混合至 13.5 μL，並於 100°C 乾浴 5 min 後，置於冰上 5 min，以將 dsRNA 變性 (denature)。之後加入 5× 緩衝液 4 μL、poly(A) polymerase 1 μL 及 25 mM ATP 2 μL 於 dsRNA 溶液中，至總體積 20 μL，混勻後置於 37°C 條件下 30 min。將 dsRNA 正反股之 3' 端各添加 poly(A) tail，最後置於 65°C，10 min 後終止反應。取 5 μL 帶有 poly(A) tail 的 dsRNA，並分別加入 XhoI oligod (T) V 引子 1 μL 及 10 mM dNTP 1 μL 後

補水至 12 μL，置於 65°C 條件下 5 min 後置於冰上。再分別加入 5× FS 緩衝液 4 μL、0.1 M DTT 1 μL 及 RNase OUT 1 μL，於 42°C 條件下處理 2 min 後，加入 1 μL SuperScriptII 反轉錄酵素，並於 42°C 作用 50 min 後，置於 70°C 條件下 15 min 終止反應。獲得之 cDNA 產物，以依 MCMV 5' 端序列設計引子 MCMV 5' RACEA 及利用已知 MCMV 鞘蛋白引子 MCMV-g3514F 分別與 XhoI oligod (T) V 引子進行 5' 端及 3' 端序列增幅，PCR 反應組成如下：2× Taq DNA Polymerase Master Mix RED 10 μM，正反股引子各 1 μL，cDNA 1–2 μL，補水至 20 μL。PCR 增幅條件為 94°C 5 min 後進行 (94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 1 min) 35 個循環，72°C 10 min 後靜置於 4°C；將 PCR 增幅產物以 1.5% 洋菜膠，在 0.5× TAE，50 V 條件下進行電泳，最後以 EtBr 染色 10 min 後，以清水退染。將預期大小產物切下後，以凝膠產物小量回收試劑組 (Gel Advanced Gel Extraction Miniprep, VioGene-Biotek Corp., New Taipei City, Taiwan) 進行回收，產物依循 T&A 選殖試劑組 (T&A™ Cloning Kit, Yeastern Biotech, New Taipei City, Taiwan) 操作流程進行接合 (ligation)，之後將接合產物依循操作流程轉入勝任細胞 (ECOS™ Competent Cells, E.coli DH5α strain, Yeastern Biotech, New Taipei City, Taiwan) 後，將菌液塗佈於 LB-agar (Amp100/IPTG/X-gal)，培養於 37°C 隔夜。待菌落形成後，取出放置於 4°C 隔夜，進行藍白篩選。為確認選殖菌落正確與否，將選殖菌落以 M13F/M13R 引子對進行菌落 PCR (Colony PCR) 增幅確認後，將菌落交由明欣生物科技定序。

生物資訊分析

以簡併式引子對增幅出產物經選殖解序後，以 NCBI 網站 (National Center for Biotechnology information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 Blastn 線上軟體進行比對。針對 MCMV 鞘蛋白序列及全長序列以套裝軟體 Lasergene 13 (DNASTar, Inc., Madison, WI, USA)，進行拼接，並將其核酸序列分別以 Clustal Ω 比對方法 (Sievers *et al.* 2011) 進行多重序列比對 (multiple sequence alignment)。將比對後的核酸序列，再於 MEGA 7.0 軟體 (Kumar *et al.* 2016) 以 neigh-

bor-joining 的方法建構 phylogenetic tree。其樹形分支的可信度，經由拔靴 (bootstrap) 方法進行 1,000 次重覆而決定。

結果

病毒分離與簡併式聚合酶鏈鎖反應及血清檢測比對鑑定

2014 年台灣各地疑似病毒病危害玉米大發生，受害植株有褪綠、嵌紋、葉片黃化、植株枯萎情形甚至植株嚴重矮化 (圖 1A、1B)，將病葉透光觀察可見明顯且平行於葉脈之褪綠條斑，甚至造成葉片嚴重黃化 (圖 1C、1D)。將由雲

林縣虎尾鎮採樣之疑似病毒病為害玉米葉片汁液機械摩擦接種於甜玉米 (*Zea mays* var. *rugosa* cv. 'Honey-236')，五週後可見新長出葉片有明顯褪綠、斑駁病徵 (圖 1E、1F)。由於無合適之單斑寄主，因此以系列稀釋接種法分離病毒，將接種後具病徵之玉米植株葉片以 $2\times$ 系列稀釋至 $20,000\times$ 分別接種於甜玉米 'Honey-236'，每稀釋濃度各接種 10 棵甜玉米 'Honey-236'，接種後發現稀釋終點為 $200\times$ 。 $2000\times$ 則無法順利接種，因此以 $500\times$ 稀釋倍率接種 3 次甜玉米 'Honey-236' 後獲得一純系病毒 (分離株：NFU2)。以自製之 SCMV 抗血清 (Deng 1985) 進行檢測呈現陰性反應，後以自行設計針對 *Tenuivirus* 屬病

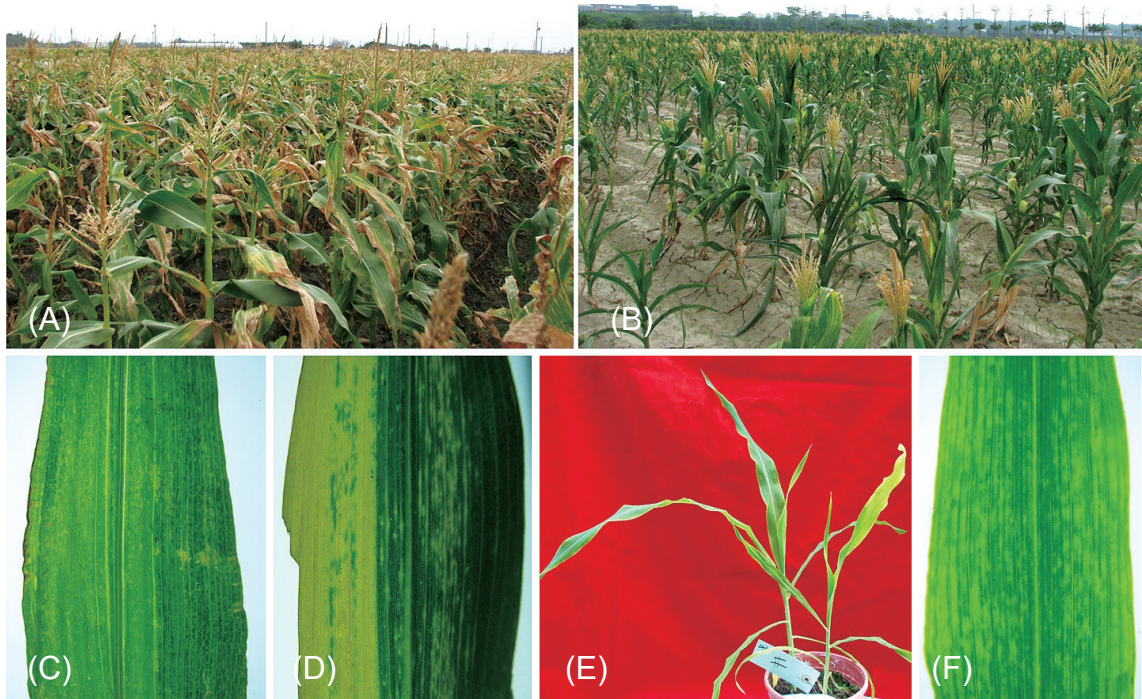


圖 1. (A) 玉米褪綠斑駁病毒於田間造成之褪綠、黃化及枯萎病徵；(B) 玉米褪綠斑駁病毒與甘蔗嵌紋病毒於田間大面積複合感染使植株嚴重矮化、簇生化、黃化且植株死亡情形；(C) 玉米褪綠斑駁病毒單獨感染葉片呈現典型褪綠斑駁與葉脈平行的條狀病斑；(D) 玉米褪綠斑駁病毒與甘蔗嵌紋病毒複合感染葉片病斑會癒合造成更嚴重的黃化病徵；(E) 病組織汁液機械摩擦接種於甜玉米 'Honey-236' 5 wk 後可見葉片呈現褪綠、黃化病徵；(F) 接種感染的玉米植株葉片組織有嵌紋病徵。

Fig. 1. (A) Field symptoms of severe mottle, chlorosis and necrosis caused by *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) infection; (B) Plants with severe stunting, rosetting, yellowing and even death caused by MCMV coinfection with *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) in the field; (C) Leaf with chlorotic mottle streaks parallel to leaf veins, typical of MCMV simplex infection; (D) Streaks coalesce to create severe yellowing symptom caused by MCMV coinfecting with SCMV; (E) Chlorotic mottle symptom appeared after 5 wk post inoculation with MCMV on sweet corn cv. 'Honey-236'; and (F) Infected leaf tissue with clear mottle symptoms caused by MCMV inoculation.

表 1. 本研究中所使用之引子對。

Table 1. List of primers in this study.

Primer pair	Sequence (5'-3')	Target or purpose	Product size (bp)	Ref.
Hrp5 Pot1	F-ATGATHGARKCNTGGGG R-GACTGGATCCATTBTCDATRCACCA	<i>Potyvirus</i> genus universal primers	750	Colinet & Kummert (1993); Pappu <i>et al.</i> (1998)
Tenui-DF1 Tenui-DR1	F-AAGAARAADWKAGDCCGTA R-ACACAAAGTCCTGGGTAWAA	<i>Tenuivirus</i> genus universal primers	1,400-1,800	This study
Potex2RC Potex5	F-TCAGTRITTDGCRTCRAARGT R-CAYCARCARGCMAARGAYGA	<i>Potexvirus</i> genus universal primers	750	van der Vlugt & Brenedsen (2002)
MCMVg3514F MCMVg4014R	F-GGGAACAACCTGCTCCA R-GGACACGGAGTACGAGA	MCMV coat protein specific primer which can be used to detect MCMV in vectors, seeds and plants	500	This study
NdeI-MCMVCP-F MCMVCP-SalI-R	F-ATCATATGGCGGCAAGTAGCC R-ATGTGCGACTCAATGATTGCCAG	MCMV coat protein expression vector construction	820	This study
MCMV-CPF MCMV-CPR	F-TGGGAATTCCAGCCAGATTA R-TGAGTTCAGAAACCCTCGTG	MCMV full coat protein sequence amplification	2,000	This study
MCMV-g3514F XhoI Oligod(T)V	F-GGGAACAACCTGCTCCA R-CTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTT	MCMV 3' region sequence amplification	947	This study
XhoI Oligod(T)V MCMV5'RACEA	F-CTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTT R-GGTGTCTGGTACACCCAACC	MCMV 5' region sequence amplification	703	This study

毒的簡併式引子對 Tenui-DF1/Teuni-DR1、*Potexvirus* 屬病毒簡併式引子對 Potex1RC/Potex5 及 *Potyvirus* 屬病毒簡併式引子對 Hrp5/Pot1 (表 1)，分別對採樣的樣本抽取之全量 RNA 進行

RT-PCR 增幅偵測可能的病毒種類。RT-PCR 增幅結果顯示，僅能於利用 *Tenuivirus* 屬病毒簡併式引子對偵測可得預期大小約 1.4-1.8 kb 之條帶 (圖 2)，*Potexvirus* 屬病毒及 *Potyvirus* 屬引子，

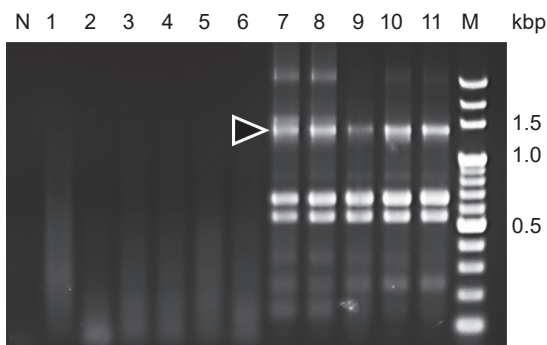


圖 2. 利用 *Tenuivirus* 屬病毒簡併式引子對偵測採集自雲林縣疑似病毒病為害玉米樣本之反轉錄聚合酶連鎖反應實驗，符合預期約 1.4 kb 大小反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR) 產物如箭頭所示。行 N：無核酸模板負對照 [diethyl pyrocarbonate (DEPC) 處理水]；行 1-11：疑似病毒病感染玉米樣本 RNA；行 M：核酸分子標準液 (Bio-100™ Mass DNA Ladder)。

Fig. 2. Detection of virus like symptom of maize samples from Yunlin County by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using *Tenuivirus* genus degenerate primers. The RT-PCR products with predicted size (1.4 kb) identified by 1.5% agarose gel electrophoresis are indicated by arrow. Lane N: No template control [diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water]; Lanes 1-11: Suspected virus infected maize sample RNA; and Lane M: Bio-100™ Mass DNA Ladder.

則未測得預期大小之條帶。將符合預期大小約 1.4 kb 產物，經選殖解序後可分別得到一段 1,367 bp 及一段 1,488 bp 的 cDNA 片段 (圖 3A)，兩片段具 101 bp 的重疊序列，可將兩片段組合為一個 2,703 bp 的單一序列重疊群 (contig) (圖 3B)。將序列上傳 NCBI 進行比對，結果顯示此序列與中國於 2012 年發表之 MCMV Yunnan3 分離株序列 (Acc. No. JQ982469) 最相近，核酸序列相同度達 99%，且此序列包含 MCMV 部分 5' 端未轉譯區序列、P32 蛋白及 RNA 依賴性 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase; RdRp) 完整序列。另外，與非洲肯亞及盧安達於 2012 及 2013 年發表之 MCMV 分離株核酸序列相似亦達 99%，而與美國於 2007 年發表之 MCMV 分離

株 “Nebraska” 相同度達 97%。1989 年於美國堪薩斯州發現之 MCMV 分離株 KS1 核酸相同度亦有 96% (表 2)，證實此一新生玉米病毒為近年來於亞非地區大發生之 MCMV。

玉米褪綠斑駁病毒 NFU2 分離株全長度基因體選殖及分析

為分析此一台灣新發生病毒之來源、針對病毒鞘蛋白序列開發檢測引子及製備表現載體，後續將 MCMV NFU2 分離株之全長度基因體序列進行解序。首先，針對 MCMV 病毒之鞘蛋白序列進行解序，依據已知之 MCMV NFU2 分離株之 RdRp 序列及 GenBank 上 MCMV 病毒 3' 端 UTR 序列設計引子 MCMV-CPF/MC-

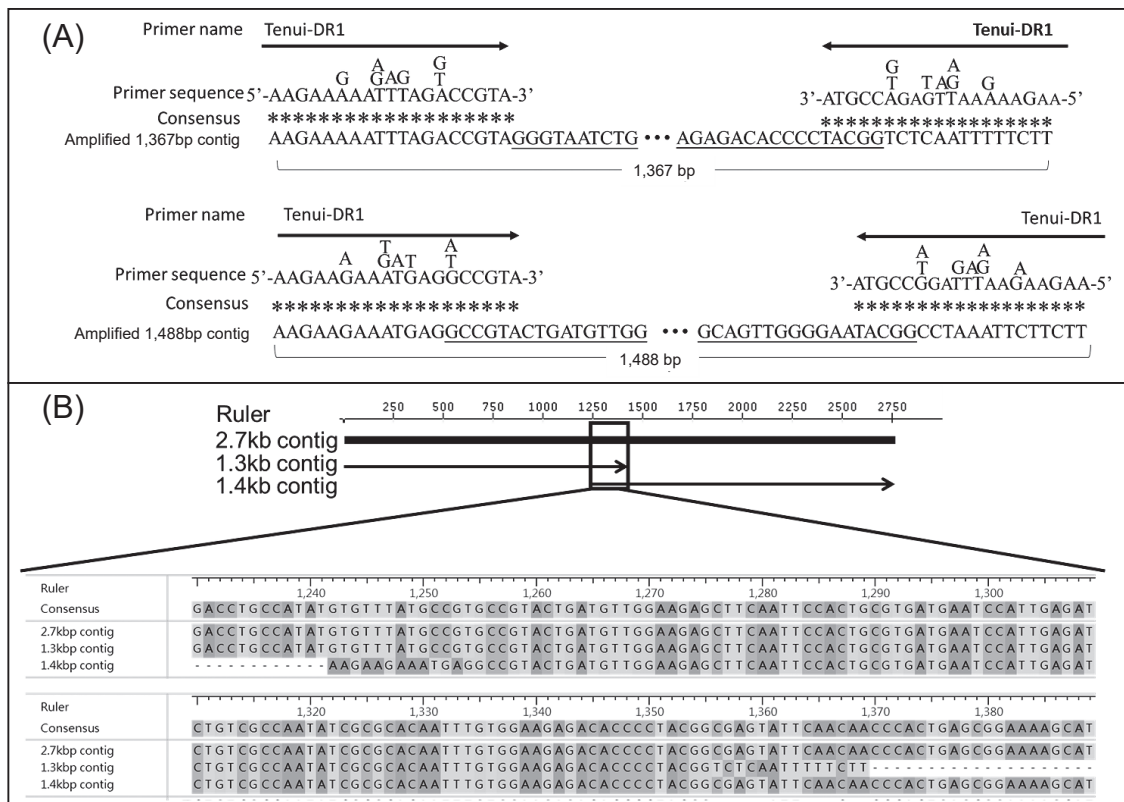


圖 3. (A) 將由 *Tenuivirus* 屬病毒引子對 (TenuiDF1/TenuiDR1) 增幅並選殖之序列與該簡併式引子對比對；(B) 兩組增幅單一序列重疊群 (contig) 間具有 101 bp 的重疊序列，可組合成一個 2.7 kbp 單一序列重疊群。

Fig. 3. Alignment of two cloned sequences which are amplified from using TenuiDF1/TenuiDR1 primer pairs with its own primer pairs. Degenerate primer pairs were presented on the top of each alignment. The arrows indicate the direction of 5' to 3' in each primer. The asterisks indicate the conserved nucleotides among all aligned DNA sequences. Underlined sequences are identical to *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) sequences. (B) These two amplified contig could combine into a 2.7 kbp contig with 101 bp overlapping sequence.

表 2. 將 *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV)-NFU2 分離株之聚合酶鏈鎖反應產物序列拼接後之單一重疊群與其他國家之 MCMV 序列相同度比較。

Table 2. Comparison of nucleotide identities of 2.7 kbp assembled contig from degenerated reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) products of *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV)-NFU2 with isolates of MCMV from other countries.

MCMV isolate (accession No.)	Country	Nucleotide identity (%)	Submitted year
Yunnan3 (JQ982469)	China	99	2012
Sichuan (JQ982470)	China	99	2012
Yunnan2 (JQ982468)	China	99	2012
Kenya (JX286709)	Kenya	99	2012
R4 (KF744396)	Rwanda	99	2013
R1 (KF744395)	Rwanda	99	2013
Nebraska (EU358605)	USA	97	2007
KS1 (X14736)	USA	96	1989

MV-CPR，經 RT-PCR 增幅擴大後，可獲得一 2 kb 產物。經選殖解序後比對，確認獲得 MCMV 病毒完整鞘蛋白核酸序列，並經親緣分析後顯示各 MCMV 分離株之全鞘蛋白核酸序列可區

分為 2 個族群 (圖 4)，分別為美國分離株群及近年來於亞非地區發生之分離株群。另外，由於 MCMV 屬於番茄叢矮病毒科 (*Tombusviridae*) 玉米褪綠斑駁病毒屬 (*Machlomovirus*)，該屬病

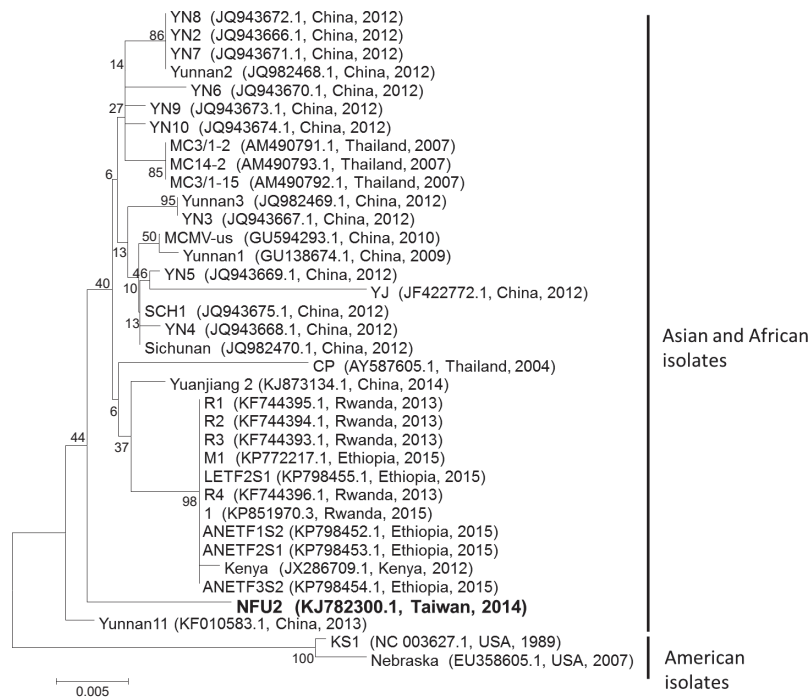


圖 4. 玉米褪綠斑駁病毒 NFU2 分離株鞘蛋白核酸序列以 MEGA 7.0 進行親緣關係分析之樹狀圖。

Fig. 4. The phylogenetic tree of coat protein nucleotide sequences of *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) NFU2 isolate and other MCMV isolates available in GenBank. The neighbor-joining tree was constructed with MEGA 7.0 and bootstrapped with 1,000 replicates. Scale bar indicates 0.005 changes per nucleic acid. The accession number of coat protein nucleotide sequence, isolation country and first GenBank submission year of each MCMV isolates are indicated following the isolate name.

毒基因體組成無 5' 端 cap 及 3' 端 poly(A) tail，因此先萃取本病毒之 dsRNA，之後以 poly(A) tailing kit 將病毒 dsRNA 兩端分別添加 poly(A) tail，再分別依據已知之 MCMV5' 端序列設計引子 MCMV5'RACEA 及利用已知 MCMV 鞘蛋白引子 MCMV-g3514F 分別與 XhoI oligod (T) V 引子進行 5' 端及 3' 端序列增幅。經選殖解序後比對，確認獲得 MCMV 病毒 5' 端及 3' 端序列 (結果未出示)。將已經獲得之 MCMV NFU2 分離株 5' 端 UTR、P32 蛋白、RdRp、P31 蛋白、鞘蛋白及 3'UTR 序列拼接後，可得 MCMV NFU2 分離株完整序列，全長為 4,436 nt。將 NFU2 分離株序列各功能蛋白及 5' 端及 3' 端 UTR 序列，與已完整解序之 MCMV 分離株核酸序列進行比對 (表 3)，結果顯示與 MCMV “NFU2” 分離株 5' 端 UTR 最相近者 (98.5%) 為 Yunnan3 及 M1 分離株，差異度最大者 (94.1%) 為 Nebraska 及 KS1 分離株；P32 蛋白最相近者 (98.9%) 為 Yunnan3 及 M1 分離株，差異度最大者 (97.5%) 為 Nebraska 分離株；RdRp 蛋白最相近者 (98.9%) 為 Yunnan3 分離株，差異度最大者 (96.4%) 為 KS1 分離株；P31 蛋白最相近者 (99.3%) 為 Yunnan3 分離株，差異度最大者 (97.1%) 為 Nebraska 分離株；鞘蛋白相近者 (98.3%) 為 M1、Yunnan 及 R1 分離株，差異度最大者 (96.3%) 為 Nebraska 分離株；sgRNA2 最相近者 (99.4%) 為 Yunnan3 分離株，差異度最大者為 R1 分離株，因其缺

乏 3' 端序列，其相同度僅有 86.6%；將 MCMV NFU2 分離株全長度序列與於 GenBank 登錄之 MCMV 全長度基因體序列進行親緣分析，由圖 5 可知 MCMV 可區分為東非分離株群、台灣分離株、中國分離株群及美國分離株群，2012 年後發生之 MCMV 分離株序列相同度皆為 99%，並且從樹形可區分出東非分離株、台灣分離株及中國分離株為同一群，而美國分離株則為另一分群，此一結果與全鞘蛋白核酸序列分析相近。

玉米褪綠斑駁病毒鞘蛋白表現載體製備與血清檢測應用

基於已經解序之 MCMV NFU2 分離株鞘蛋白核酸序列，可以將該鞘蛋白序列以 NdeI-MC-MVCP-F/MCMVCP-SalI-R 引子對增幅後構築於 pET28b (+) 表現載體上，並轉型至 *E. coli* strain Rosetta (DE3) 大腸桿菌細胞中，並重新抽取 MCMV-NFU2 CP 表現載體經 PCR 增幅選殖確認序列正確，之後以 IPTG 誘導產生 MC-MV-NFU2 CP 表現蛋白因帶有部分表現載體序列，產物大小約 28 kDa，略大於 MCMV 感染玉米葉片之 CP 大小 (約 25 kDa) (圖 6A)。西方轉漬法分析結果顯示，MCMV-NFU2 表現蛋白可與購自 AC Diagnostics 之 MCMV 抗血清有專一性反應 (圖 6B)。將此表現蛋白經白兔免疫注射後所製備之抗血清用於 ELISA 試驗檢測田間

表 3. *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV)-NFU2 分離株與其他 MCMV 分離株之 5' 端 UTR、P32 蛋白、RdRp、P31 蛋白、鞘蛋白及 sgRNA2 核酸序列相同度比較。

Table 3. Comparison of nucleotide identities of 5'UTR, P32, RdRp, P31 and subgenomic RNA 2 of *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV)-NFU2 with isolates of MCMV from other countries.

Country	Isolate	MCMV genome sequence identity (%)					
		5'UTR	P32	RdRp	P31	CP	sgRNA2
Taiwan	NFU2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Ethiopia	M1	98.5	98.9	98.8	98.9	98.3	92.6 ^z
China	Yunnan3	98.5	98.9	98.9	99.3	98.2	99.4
China	Yunnan	97.1	98.6	98.8	98.3	98.3	96.7
Kenya	Kenya	96.3	98.7	98.8	98.8	98.2	99.7
Rwanda	R1	94.1	98.6	98.8	98.9	98.3	86.6
USA	Nebraska	94.1	97.5	96.7	97.1	96.3	98.2
USA	KS1	94.1	98.6	96.4	97.6	96.6	98.2

^z Ethiopian isolate M1 and Rwandian isolate R1 have lack of partial sgRNA2 sequence at the end.

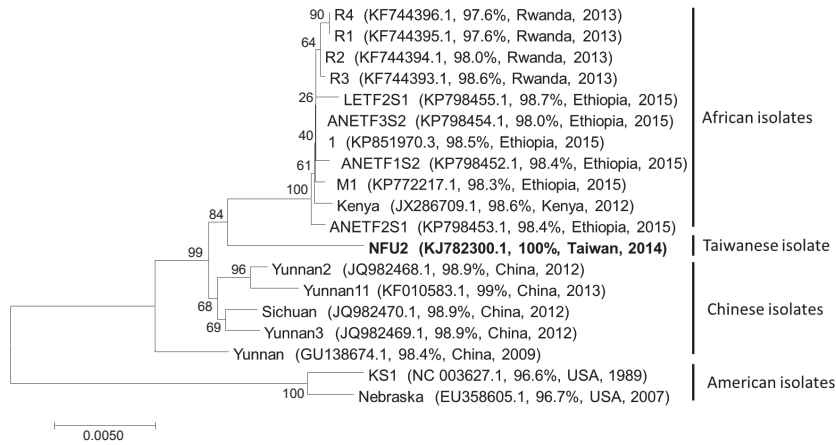


圖 5. 玉米褪綠斑駁病毒基因體 NFU2 分離株全長度核酸序列以 MEGA 7.0 進行親緣關係分析之樹狀圖。

Fig. 5. The phylogenetic tree of complete genome sequences of *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) NFU2 isolate and other MCMV isolates available in GenBank. The neighbor-joining tree was constructed with MEGA 7.0 and bootstrapped with 1,000 replicates. Scale bar indicate 0.005 changes per nucleotide. The accession number of complete nucleotide sequence, sequence identity, isolation country and first GenBank submission year of each MCMV isolates are indicated following the isolate name.

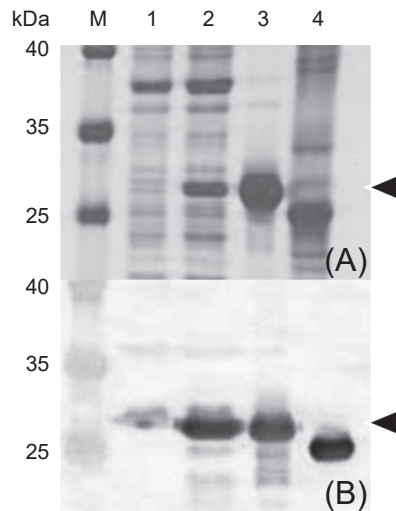


圖 6. 轉型細菌經誘導後大量表現 *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV)-NFU2 鞘蛋白之蛋白質電泳及西方轉漬分析。(A) 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 分析；(B) 西方轉漬法分析。

Fig. 6. Expression of *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV)-NFU2 coat protein in *E. coli* strain Rosetta (DE3) demonstrated after protein induction by isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG). (A) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with coomassie blue staining of the 28 KDa bacterial expressed recombinant MCMV-NFU2 coat protein which indicated by arrow; and (B) Western blot assay of the recombinant MCMV-NFU2 coat protein was reacted with the 500 \times diluted antiserum against MCMV which purchased from AC Diagnostics, Inc. Lane M, protein marker; Lane 1, pET28b (+) without insert; Lane 2, pET28b (+) with MCMV-NFU2 CP insert; Lane 3, purified bacterial expressed recombinant MCMV-NFU2 coat protein; and Lane 4, MCMV-infected maize leaf. Sample of each number of lanes were the same in SDS-PAGE and western blotting results.

樣本，結果顯示自製之 MCMV 抗血清可穩定偵測出感染 MCMV 之玉米樣本 (表 4)，總共採樣 11 個田間疑似 MCMV 感染樣本，皆可順利測得 MCMV 陽性反應，而健康對照反應背景值低。

分子檢測引子對開發及應用

由於 MCMV 為一可藉由薊馬媒介傳毒之植物病毒，為檢測薊馬是否可能為台灣 MCMV

傳毒之媒介昆蟲，本研究利用針對不同 MCMV 分離株鞘蛋白保守序列設計一專一性引子對 MCMV-g3514F/MCMV-g4014R，並用以檢測 MCMV 大發生之田間捕獲薊馬。經鑑定後，該薊馬為玉米薊馬，並以專一性引子對檢測，結果顯示此引子對可用於檢測採集之單隻玉米薊馬體內帶毒與否 (圖 7)。此外，經測試此專一性引子對，可應用於檢測葉片是否感染 MCMV，

表 4. 自製與商用抗體用於酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 檢測玉米樣本感染 *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) 之效果比較。

Table 4. Comparative results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using homemade and commercialized antibodies to detect *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) on maize.

Maize sample	MCMV antibody	
	Homemade ^z	AC Diagnostics ^y
1	1.92 ^x	2.14 ^x
2	2.59	2.28
3	0.19	0.75
4	3.19	2.22
5	1.78	2.39
6	0.21	0.98
7	1.94	1.60
8	0.59	1.40
9	0.38	1.46
10	0.46	0.97
11	0.56	2.28
Diseased positive control	3.29	3.03
Healthy control threshold	0.13	0.11

^z Purified immunoglobulin G (1 mg mL⁻¹) of antiserum against MCMV-NFU2 with 250× dilution.

^y Immunoglobulin G against MCMV purchased from AC Diagnostics Inc. with suggested 1000× dilution.

^x Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) values (Absorbance at 405 nm, A_{405nm}).

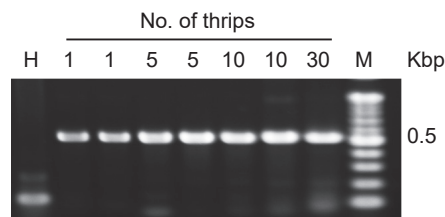


圖 7. 應用 *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) 專一性引子對檢測田間玉米薊馬帶毒情形。

Fig. 7. Agarose gel electrophoresis analysis of amplified *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) cDNA products from field collected maize thrips by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with MCMV specific primers MCMV-g3514F/MCMV-g4014R. Numbers of maize thrips were indicated above each lane: Lane H, Healthy maize leaf was used as negative control; and Lane M, Bio-100TM Mass DNA Ladder.

種子是否有帶毒以及其他可能潛在媒介昆蟲是否帶毒等 MCMV 病毒檢測實驗(結果未出示)。

玉米褪綠斑駁病毒病害發生調查

玉米褪綠斑駁病毒為近年來新發生且嚴重危害玉米之病毒，由於其傳播特性關係，於台灣田間有大發生情形，於雲林縣、嘉義縣市、台南市、高雄縣、苗栗縣、台中市、彰化縣、花蓮縣、台東縣等地區採樣疑似病毒病危害食用玉米樣本共 306 個，其中 MCMV 罹病率為 79.7% (共 244 個樣本呈現 MCMV 陽性反應)，MCMV 與 SCMV 複合感染比率為 31.7% (共 97

個樣本呈現 MCMV 及 SCMV 陽性反應)(表 5)。其中，各地區 MCMV 罹病率介於 68.4–87.1% 之間，MCMV 及 SCMV 複合感染比率則變化較大，雲林縣部分為 0%，高雄縣燕巢區則為 71%；分析受 MCMV 感染玉米種類結果顯示如表 6，市面上常見之食用商業品種，如「金蜜」、「真滋蜜」、「彩珍」、「夏強」、「夏珍」、「白龍王」、「雙發」、「Devotion」、「台南 22 號」及「玉美珍」等品種 MCMV 罹病率皆達 80% 以上，這些玉米種類包括雙色甜玉米、黃色甜玉米、白色甜玉米、白玉米及糯玉米等玉米品種，而青割玉米及「明豐 3 號」飼料玉米各調查 22 個

表 5. 2014 年至 2015 年間台灣食用玉米發生 *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) 及 *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) 調查結果。

Table 5. Occurrence of *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) and *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) on symptomatic maize plants collected in Taiwan from 2014 to 2015.

Location	No. of plants assayed	Number and percentage of maize infected with MCMV ^z	Number and percentage of maize coinfecting with MCMV and SCMV ^y
Yunlin County	86	74 (86.0%)	0 (0%)
Chiayi County	60	49 (81.6%)	14 (23.3%)
Yanchao Dist., Kaohsiung City	62	54 (87.1%)	44 (71.0%)
Other places	98	67 (68.4%)	39 (39.8%)
Total	306	244 (79.7%)	97 (31.7%)

^z Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests with antiserum against *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) were performed.

^y ELISA tests with antiserum against MCMV and *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) were performed.

表 6. 2014 年至 2015 年間台灣不同品種玉米之 *Maize chlorotic mottle* (MCMV) 感染率調查結果。

Table 6. Incidence of *Maize chlorotic mottle* (MCMV) in different maize cultivars in Taiwan from 2014 to 2015.

Maize cultivar	Type	No. of plant assayed	Number and percentage of maize infected with MCMV (Percentage) ^z
‘Chen-tzu-mi’ 「真滋蜜」	Bicolor sweet corn	15	15 (100%)
‘SC2015’ 「雙發」	Bicolor sweet corn	55	49 (89.1%)
‘Sweet Jean’ 「彩珍」	Bicolor sweet corn	16	16 (100%)
‘Devotion’	White sweet corn	9	9 (100%)
‘White Dragon King’ 「白龍王」	White sweet corn	42	36 (85.7%)
‘SC-34’ 「金蜜」	Yellow sweet corn	15	15 (100%)
‘Chia-Chiang’ 「夏強」	Yellow sweet corn	5	4 (80.0%)
‘Bright Jean’ 「華珍」	Yellow sweet corn	25	15 (60.0%)
‘Tainan No. 22’ 「台南 22 號」	White corn	30	25 (83.3%)
‘White pearl’ 「玉美珍」	Waxy corn	73	62 (84.9%)
Unknown	Forage corn	22	7 (31.8%)
‘Ming-Feng No. 3’ 「明豐 3 號」	Feed corn	117	37 (31.6%)

^z Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests with antiserum against *Maize chlorotic mottle* (MCMV) were performed.

及 117 個樣本，MCMV 罹病率分別為 31.8% 及 31.6%。所有甜玉米品種中，「華珍」玉米病毒罹病率較低，但也達到 60%。

討論

在台灣玉米感染植物病毒的鑑定報告於 2014 年以前僅有 MDMV-B (現為 SCMV, *Potyvirus* 屬病毒) 及 MSpV (*Tenuivirus* 屬病毒) 兩種病毒，故於 2014 年春天於雲林縣虎尾鎮採集之嚴重黃化、嵌紋且矮化之玉米植株，經以自製之 SCMV 抗血清進行 ELISA 檢測未得陽性反應，遂以已經存在台灣之兩屬玉米病毒簡併式引子對進行檢測。檢測結果僅自行設計之 *Tenuivirus* 屬病毒簡併式引子對可針對部分樣品增幅出預期之條帶大小，且經選殖解序後分別獲得兩組大小約 1.4 kb，分別位於 MCMV 的 RdRp 5' 端及 3' 端，且兩段序列可進行拼裝後組成一單一序列重疊群，並經比對確認為 MCMV。此一非預期之解序結果，可能係由於進行 degenerate RT-PCR 時黏合溫度 (annealing temperature) 較低所致，且運用該 *Tenuivirus* 屬病毒引子對針對 MSpV 進行增幅時亦會發生可分別增幅 RNA-2 及 RNA-3 (未發表結果)，該引子對序列或具特殊性，可做為跨病毒屬且可針對同一病毒不同片段進行增幅，此須進一步研究才可瞭解。

Adams *et al.* (2013)、Adams *et al.* (2014) 和 Mahuku *et al.* (2015b) 發表的結果指出，MCMV 可分為 3 個族群，分別為美國分離株、中國分離株及東非分離株。將全解序之 MCMV NFU2 分離株親源分析，結果依照來源地顯示共可分群為美國分離株、中國分離株、東非分離株及台灣分離株，此分群結果顯示台灣分離株與東非分離株在演化關係上較為接近。分析 5' 端 UTR、P32 蛋白、RdRp、P31 蛋白、鞘蛋白及 sgRNA2 等核酸序列，顯示 MCMV NFU2 分離株與其他各國全解序 MCMV 分離株在 5' 端 UTR 及鞘蛋白序列歧異度較高。若進一步將鞘蛋白序列進行親源分析，MCMV NFU2 分離株鞘蛋白序列與東非分離株及泰國於 2004 年登錄之 CP 分離株屬同一分群，雖然泰國於 2007 年所分離的 MC3/1-15 等分離株較接近中國分離株，但整體而言該親源樹除美國分離株外，其

他分枝的 MCMV 分離株核酸變異度較低，且在大分枝樹形的信賴度小於 40，顯示東非分離株、台灣分離株、中國分離株及泰國分離株起源可能為同一來源，此一分析結果與 Wu *et al.* (2013) 分析結果相近。而亞非國家中又以泰國於 1983 年最先報導 (Klinkong & Sutabutra 1982)，之後至 2004 年才有首筆分析 MCMV 鞘蛋白紀錄，藉由親源分析合理推測近年來爆發之 MCMV 分離株可能由泰國分離株分化而來；且後續分析實驗室 2013 年採樣分離之玉米樣本即有 MCMV 感染之情形 (結果未出示)，因此台灣的 MCMV 分離株應早於 2013 年以前即由國外傳入台灣。

基於各分離株鞘蛋白相同度在 96% 以上，將 MCMV NFU2 分離株之鞘蛋白序列構築於表現載體並誘導大量表現，獲得之 MCMV NFU2 CP 表現蛋白可以穩定檢測 MCMV 田間樣本，有利後續田間生態及病害流行調查；MCMV 專一性引子對檢測證明單一玉米薊馬可以有效獲毒，後續進行傳毒試驗亦可成功，並且經調查玉米薊馬在田間條件合適時具有高密度 (未發表結果)，藉由專一性引子對的檢測可以分析媒介昆蟲的獲毒、傳毒、保毒等相關資料，未來將可提供相關防治策略的擬定。目前防檢局已經公告之賜諾特、納乃得及撲滅松等多種類型藥劑可供輪替使用，此外該引子對亦可應用於田間玉米樣本的檢測或是種子的檢測，可提供檢測時更靈敏的檢測工具。

MCMV 於台灣在 2014 年中南部地區大面積的發生危害，由於許多玉米栽培區幾乎同時間發生大面積黃化乾枯情形，許多田區幼苗期即有黃化斑駁情形，農民懷疑是否有種子帶毒情形。經將大面積發生的玉米田區農民使用所剩玉米籽粒共七個品種各千粒種子，以群體方式取樣後以 MCMV 抗血清進行檢測，結果顯示皆未測得種子帶有 MCMV 情形 (結果未出示)。研判若使用合格廠商提供之種子帶毒比率極低或無，此外在尚未清楚病原的情況下，錯誤的殺菌劑、殺蟲劑使用層出不窮，經確診為 MCMV 病毒感染後始能對症下藥。而經過調查，當時農民常用的各種甜玉米品種罹病率皆達 80% 以上，「華珍」品種則罹病率較低 (60%)，但其甜度、果皮厚度等性狀較差，若欲選擇「華珍」作

為栽培品種須將品質納入考慮；而同一時間田間調查 MCMV 感染青割玉米及硬質玉米的罹病率約 30% 左右，由於其栽培習慣較粗放，因此實際調查其植株上玉米薊馬密度仍偏高，但受 MCMV 感染植株比率較低，且病徵僅多為褪綠斑駁或輕微矮化、較無大面積黃化、枯死情形；分析台灣各地區 MCMV 及 MLN 發生情形，結果顯示雲林地區僅有 MCMV 發生，嘉義縣及其他玉米栽培區則為 23–39% 之間，高雄市燕巢區為單一有機栽培農場，在未積極管理媒介昆蟲下，顯示 MLN 罹病率可以達到 71%，在病害大發生狀況下可能導致絕收情形；後續以自製之 MCMV 及 SCMV 抗血清進行大規模調查，共計調查 4,551 個樣本，結果顯示 MCMV 全年罹病率逾 60% 以上，夏季罹病率遠低於冬春季種植期，冬春作發病高峰最高可達 100%，然而 MLN 罹病率則僅約 2.5% (未發表結果)。相較於各國的 MLN 罹病率，美國為 13%，肯亞 67.6%，衣索比亞 33.8–62.1%、盧安達 75%，厄瓜多爾 22.9%，剛果民主共和國 0%，台灣的 MLN 罹病率顯著低於除剛果民主共和國外之其他各國，因此在防治策略上應首重 MCMV 的媒介昆蟲防治，後續的抗病育種也應優先著重於抗 MCMV 的玉米品種育成。

誌謝

本文承蒙行政院農業委員會科技計畫 103 農科-6.2.3-農-C1、動植物防疫檢疫局 104-救助調整-檢-01、105-救助調整-檢-02 補助試驗經費，感謝曾梓璋先生、劉秋玉小姐在試驗上的協助，感謝鐘大焜先生、許宏文先生、林傳凱先生、廖宏洲先生、周義筆先生、虎尾科技大學生物科技系羅朝村教授、花蓮區農業改良場蔡依真小姐及台東區農業改良場林駿奇先生在田間採樣的協助，謹此誌謝。

引用文獻

Adams, I. P., V. A. Harju, T. Hodges, U. Hany, A. Skelton, S. Rai, M. K. Deka, J. Smith, A. Fox, B. Uzayisenga, A. Rutikanga, M. Rutherford, B. Richis, N. Phiri, and N. Boonham. 2014. First report of maize lethal necrosis disease in Rwanda. *New Dis. Rep.*

29:22.

- Adams, I. P., D. W. Miano, Z. M. Kinyua, A. Wangai, E. Kimani, N. Phiri, R. Reeder, V. Harju, R. Glover, U. Hany, R. Souza-Richards, P. Deb Nath, T. Nixon, A. Fox, A. Barnes, J. Smith, A. Skelton, R. Thwaites, R. Mumford, and N. Boonham. 2013. Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of *Maize chlorotic mottle virus* and *Sugarcane mosaic virus* causing maize lethal necrosis in Kenya. *Plant Pathol.* 62:741–749.
- Cabanas, D., S. Watanabe, C. H. V. Higashi, and A. Bresan. 2013. Dissecting the mode of *Maize chlorotic mottle virus* transmission (Tombusviridae: Machlomovirus) by *Frankliniella williamsi* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.* 106:16–24.
- Castillo, J. and T. T. Hebert. 1974. A new virus disease of maize in Peru. *Fitopatologia* 9:79–84.
- Chao, C. H., C. C. Chen, H. W. Chiang, and E. S. Wang. 1988. The occurrence of *Maize stripe virus* in Taiwan. *Bull. Taichung Dist. Agric. Improv. Stat.* 21:23–31.
- Chen, C. C., T. Hsiang, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2002. Molecular characterization of *Tuberose mild mosaic virus* and preparation of its antiserum to the coat protein expressed in bacteria. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43:13–20.
- Chiang, K. S., T. C. Deng, H. H. Lai, and S. F. Wang. 2007. A statistical method to estimate virus seed-transmission rate by results of group tests. *Plant Pathol. Bull.* 16:225–229. (in Chinese with English abstract)
- Chou, C. M., F. C. Lin, T. C. Deng, Y. H. Chien, C. T. Chen, Y. J. Chen, C. H. Tsai, and H. W. Huang. 2015. The epidemic and transmission studies of *Maize chlorotic mottle virus*. p.31–42. *in: Proceedings of the Symposium on Important New Emerging Crop Diseases in Taiwan and Their Controls.* September 18, 2015. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung, Taiwan. (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.
- Colinet, D. and J. Kummert. 1993. Identification of a sweet potato feathery mottle virus isolate from China (SPFMV-CH) by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Virol. Methods* 45:149–159.
- Delgadillo Sanchez, F. and R. Gaytan Beltran. 1987. Identificación de la enfermedad de la “necrosis letal” del maíz en el estado de guajuato. *Rev. Mex.*

- Fitopatol. 5:21–26.
- Deng, T. C. 1985. Identification of *Maize dwarf mosaic virus* B strain and screening for resistance of corn. *J. Agric. Res. China* 34:195–206. (in Chinese with English abstract)
- Deng, T. C., C. M. Chou, C. T. Chen, C. H. Tsai, and F. C. Lin. 2014a. First report of *Maize chlorotic mottle virus* on sweet corn in Taiwan. *Plant Dis.* 98:1748.
- Deng, T. C. and C. H. Huang. 1986. Purification and antiserum preparation of *Maize dwarf mosaic virus*. *J. Agric. Res. China* 35:350–359. (in Chinese with English abstract)
- Deng, T. C., C. H. Tsai, C. M., Chou, and F. Y. Ning. 2014b. Molecular and serological characterizations of *Sugarcane mosaic virus* strains occurred in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 56:154–155. (in Chinese)
- Fentahun, M., T. Feyissa, A. Abraham, and H. R. Kwak. 2017. Detection and characterization of *Maize chlorotic mottle virus* and *Sugarcane mosaic virus* associated with maize lethal necrosis disease in Ethiopia: an emerging threat to maize production in the region. *Eur. J. Plant Pathol.* 149:1011–1017.
- Giegerich, R., F. Meyer, and C. Schleiermacher. 1996. GeneFisher-software support for the detection of postulated genes. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 4:68–77.
- Goldberg, K. B. and M. K. Brakke. 1987. Concentration of *Maize chlorotic mottle virus* increased in mixed infections with *Maize dwarf mosaic virus*, strain B. *Phytopathology* 77:162–167.
- Gong, H. Y., Y. J. Zhang, Z. Y. Zhang, H. J. Chen, B. D. Gao, and S. F. Zhu. 2010. Detection and identification of *Maize chlorotic mottle virus* from imported maize seeds. *Acta Phytopathol. Sin.* 40:426–429. (in Chinese with English abstract)
- Jensen, S. G., D. S. Wysong, E. M. Ball, and P. M. Higley. 1991. Seed transmission of *Maize chlorotic mottle virus*. *Plant Dis.* 75:497–498.
- Jiang, X. Q., L. J. Meinke, R. J. Wright, D. R. Wilkinson, and J. E. Campbell. 1992. *Maize chlorotic mottle virus* in Hawaiian-grown maize: Vector relations, host range and associated viruses. *Crop Prot.* 11:248–254.
- Klinkong, T. and T. Sutabutra. 1982. A new virus disease of maize in Thailand. p.191–193. *in: Proceedings of International Maize Virus Disease Colloquium and Workshop.* August 2–6, 1982. Wooster, OH. The Ohio State Univ., Columbus, OH.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870–1874.
- Lei, Q. W., M. D. Li, M. Yuan, and Y. Y. Wang. 2013. Detection of *Maize chlorotic mottle virus* in maize seeds imported from Thailand. *J. Huazhong Agric. Unvi.* 32:51–54. (in Chinese with English abstract)
- Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of *Dasheen mosaic virus* (Caladium isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. *Arch. Virol.* 143:2461–2469.
- Liu, H. Y., Z. M. Liu, J. L. Zhang, and H. X. Zhang. 2011. Detection and identification of *Maize chlorotic mottle virus* from imported maize seeds. *J. Northeast Agric. Univ.* 42:36–40.
- Lommel, S. A., A. H. McCain, and T. J. Morris. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72:1018–1022.
- Lukanda, M., A. Owati, P. Ogunsanya, K. Valimunzigha, K., Katsongo, H. Ndemere, and P. L. Kumar. 2014. First Report of *Maize chlorotic mottle virus* infecting maize in the Democratic Republic of the Congo. *Plant Dis.* 98:1448.
- Mahuku, G., B. E. Lockhart, B. Wanjala, M. W. Jones, J. N. Kimunye, L. R. Stewart, B. J. Cassone, S. Sevgan, J. O. Nyasani, E. Kusia, P. L. Kumar, C. L. Niblett, A. Kiggundu, G. Asea, H. R. Pappu, A. Wangai, B. M. Prasanna, and M. G. Redinbaugh. 2015a. Maize lethal necrosis (MLN), an emerging threat to maize-based food security in sub-saharan Africa. *Phytopathology* 105:956–965.
- Mahuku, G., A. Wangai, K. Sadessa, A. Teklewold, D. Wegary, D. Ayalneh, I. Adams, J. Smith, E. Bottomley, S. Bryce, L. Braidwood, B. Feyissa, B. Regassa, B. Wanjala, J. N. Kimunye, C. Mugambi, K. Monjero, and B. M. Prasanna. 2015b. First report of *Maize chlorotic mottle virus* and maize lethal necrosis on maize in Ethiopia. *Plant Dis.* 99:1870.
- Nault, L. R., W. P. Styer, M. E. Coffey, D. T. Gordon, L. S. Negi, and C. L. Niblett. 1978. Transmission of *Maize chlorotic mottle virus* by chrysomelid beetles. *Phytopathology* 68:1071–1074.
- Niblett, C. L. and L. E. Claffin. 1978. Corn lethal necrosis—a new virus disease of corn in Kansas. *Plant Dis. Rep.* 62:15–19.
- Pappu, S. S., R. Brand, H. R. Pappu, E. P. Rybicki, K. H. Gough, M. J. Frenkel, and C. L. Niblett. 1993. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to *Dasheen mosaic virus*. *J. Virol. Methods* 41:9–20.
- Pappu, S. S., H. R. Pappu, C. A. Chang, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Differentiation of biological

- cally distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. *Plant Dis.* 82:1121–1125.
- Quito-Avila, D. F., R. A. Alvarez, and A. A. Mendoza. 2016. Occurrence of maize lethal necrosis in Ecuador: A disease without boundaries? *Eur. J. Plant Pathol.* 146:705–710.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org> (visit in 2013)
- Scheets, K. 1998. *Maize chlorotic mottle machlomovirus* and *Wheat streak mosaic rymovirus* concentrations increase in the synergistic disease corn lethal necrosis. *Virology* 242:28–38.
- Scheets, K. 2002. Machlomovirus. p.1179–1182. *in: The Springer Index of Viruses.* (Tidona, C. A., G. Darai, and C. Büchen-Osmond, eds.) Springer. Berlin, Germany. 1512 pp.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539.
- Teyssandier, E. E., S. F. Nome, and E. Dal Bo. 1982. Maize virus diseases in Argentina. p.93–99. *in: Proceedings of International Maize Virus Disease Colloquium and Workshop.* August 2–6, 1982. Wooster, OH. The Ohio State Univ., Columbus, OH.
- Uyemoto, J. K. 1983. Biology and control of *Maize chlorotic mottle virus*. *Plant Dis.* 67:7–10.
- van der Vlugt, R. A. A. and M. Berendsen. 2002. Development of a general *Potexvirus* detection method. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:367–371.
- Valverde, R. A., J. A. Dodds, and J. A. Heick. 1986. Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology* 76:459–465.
- Wangai, A. W., M. G. Redinbaugh, Z. M. Kinyua, D. W. Miano, P. K. Leley, M. Kasina, G. Mahuku, K. Scheets, and D. Jeffers. 2012. First report of *Maize chlorotic mottle virus* and maize lethal necrosis in Kenya. *Plant Dis.* 96:1582.
- Wu, J. X., Q. Wang, H. Liu, Y. Qian, Y. Xie, and X. P. Zhou. 2013. Monoclonal antibody-based serological methods for *Maize chlorotic mottle virus* detection in China. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 14:555–562. (in Chinese with English abstract)
- Xie, L., J. Z. Zhang, Q. Wang, C. M. Meng, J. A. Hong, and X. P. Zhou. 2011. Characterization of *Maize chlorotic mottle virus* associated with maize lethal necrosis disease in China. *J. Phytopathol.* 159:191–193.
- Zhao, M. F., H. H. Ho, Y. X. Wu, Y. Q. He, and M. J. Li. 2014. Western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) transmits *Maize chlorotic mottle virus*. *J. Phytopathol.* 162:532–536.

Phylogenetic Analysis and Occurrence of *Maize chlorotic mottle virus* Infecting Maize in Taiwan

Chien-Ming Chou¹, Chun-Tao Chen², Yi-Hsuan Chien³, Chin-Hui Tsai³, Chin-Chih Chen¹,
Feng-Chyi Lin⁴, Yi-Ju Chen⁵, and Ting-Ching Deng^{6,*}

Abstract

Chou, C. M., C. T. Chen, Y. H. Chien, C. H. Tsai, C. C. Chen, F. C. Lin, Y. J. Chen, and T. C. Deng. 2018. Phylogenetic analysis and occurrence of *Maize chlorotic mottle virus* infecting maize in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 67(2):191–208.

Maize samples showing chlorotic, yellowing and leaf necrosis symptoms were collected in Huwei Township, Yunlin County in February 2014. After inoculation by leaf sap, the similar chlorotic mottle symptom was developed on sweet corn cv. 'Honey-236' and a pure virus isolate "NFU2" was obtained from infected sweet corn by a serial inoculation. The total RNA of "NFU2" isolate was extracted to conduct a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with the degenerate primer (Tenui-DF1/Tenui-DR1) and that yields a 1.4 kb product. The product could combine into one single contig, and this contig shared 99% sequence identities with Chinese *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) "Yunnan3" (Acc. No. JQ982469). The complete sequence of MCMV "NFU2" was as 4,436 nucleotides. Through whole genome sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that MCMV could be divided into four groups, including American isolates, Chinese isolates, East African isolates and Taiwanese isolate. Phylogenetic analysis with nucleotide sequences of MCMV coat protein showed that MCMV isolates which were prevalent in Asia and Africa in recent years could possibly share the common ancestor of MCMV from Thailand. MCMV coat protein sequence was constructed into expression system of *Escherichia coli* Rosetta strain and the expressed viral coat protein was purified for antiserum production. Homemade MCMV antiserum could be used in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for MCMV detection in field samples. Furthermore, based on MCMV coat protein gene, a specific primer pair (MCMV-g3514F/MCMV-g4014R) for RT-PCR was developed, and by which the MCMV could be detected from a single maize thrip (*Frankliniella williamsi* Hood). These detection tools are available for further study of insect transmission mechanism of MCMV. Survey of 306 maize samples in Taiwan from 2014 to 2015 by indirect ELISA using antibodies against MCMV and/or *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). The results indicated that incidence of MCMV reached 79.7% and maize lethal necrosis (MLN) caused by MCMV and SCMV reached 31.7%. Maize samples including sweet corns, white corns, waxy corns, forage corns and dent corns were all MCMV-infected. Sweet corn cv. 'Bright Jean' has the lower incidence (60%) among the green corn and comparing with incidence 31.6% of forage corn and dent corn. This is the first report about complete genome sequence, phylogenetic analysis, detection reagent development and field survey of MCMV infecting maize in Taiwan.

Key words: *Maize chlorotic mottle virus*, *Sugarcane mosaic virus*, Phylogenetic analysis, Detection reagent, Field survey.

Received: May 22, 2017; Accepted: October 23, 2017.

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

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

² Associate Technical Specialist, Hsinchu Branch, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Taoyuan, Taiwan, ROC.

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

⁴ Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁵ Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁶ Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.