

宮燈百合 *Gloriosa stripe mosaic virus* 之核酸分子和免疫法 鑑定

陳金枝^{1*} 江芬蘭² 黃春惠²

摘要

陳金枝、江芬蘭、黃春惠。2018。宮燈百合 *Gloriosa stripe mosaic virus* 之核酸分子和免疫法鑑定。台灣農業研究 67(3):229–246。

本研究於進口宮燈百合 (*Sandersonia aurantiaca* Hook) 檢測出一種 *Potyvirus* 屬病毒，經鞘蛋白 (coat protein; CP) 核酸序列分析，確認其乃屬於嘉蘭條斑嵌紋病毒 (*Gloriosa stripe mosaic virus*; GSMV) 成員，分離株代號 CB。CB 分離株以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 法由其核酸 3' 端之 polyA 起始，往 5' 端以不同引子對分段增幅，進而選殖其核酸片段進行定序，共解得 9,455 個核苷酸，其內包含對應全長度大蛋白之 9,156 個核苷酸 (對應 3,052 個胺基酸)，相關序列已登錄於 GenBank 並取得登錄序號為 EF427894。對應 CB 分離株之 CP 有 798 個核苷酸，可轉譯出 266 個胺基酸。本研究由宮燈百合和火焰百合 (即嘉蘭) (*Gloriosa* spp.) 另分別定序得到 5 個 GSMV 分離株的 CP 核苷酸序列，並均登錄於 GenBank 取得序號，包括來自宮燈百合的 CB4 (KT764122) 和 CB18 (KT764123)；來自火焰百合的 GL2 (KT764120)、GL3 (KT764124) 和 GL4 (KT764121)。所有分離株與國外已登錄之火焰百合 GSMV 分離株 (EU042761) 間，CP 胺基酸序列相同度介於 86.5–94.0%，均屬於 GSMV 成員。而由類緣關係顯示，來自 3 個宮燈百合 GSMV 分離株間有較相近的分群。依據 CB-CP 核苷酸序列設計 3 組引子對 (上游引子分別為 GSMV715u、GSMV660u 及 GSMV500u，搭配共同下游引子 GSMVd)，以 GSMV660u/GSMVd 及 GSMV500u/GSMVd 兩組引子對，於 RT-PCR 法中均可檢測出宮燈百合和火焰百合上之 GSMV；而 GSMV715u/GSMVd 僅可檢測到宮燈百合 GSMV，對感染火焰百合之 GSMV 則無預期片段被增幅出，此引子對可應用於宮燈百合 GSMV 之鑑別性檢測。將 CB-CP 全長度核苷酸選殖於表現載體 pET28b 上，轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 宿主內誘導表現蛋白之生成，將預估分子量約 31.6 kDa 之細菌表現蛋白純化後，經兔免疫注射而獲得對應 CB-CP 之多元抗體。於 indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 和西方墨點法中，此 CB 多元抗體可與同源抗原 (CB-CP 表現蛋白) 產生反應，也可成功檢出宮燈百合和火焰百合之 GSMV 罹病組織。GSMV 為文獻上發生於火焰百合之病毒記錄，但於宮燈百合上為首次發現，本研究並為首度完成 GSMV 全長度核酸定序者。本研究所製備之 GSMV 引子對及多元抗體，均已應用於進口宮燈百合種球之病毒監測，可提升我國對 GSMV 之自主檢測能力。

關鍵詞：宮燈百合、嘉蘭條斑嵌紋病毒、全長度核酸序列、RT-PCR 檢測、多元抗體。

前言

宮燈百合 (*Sandersonia aurantiaca* Hook) 別名宮燈花、中國燈籠、聖誕百合，英文名稱

為 Christmas bells。原產於南非，而紐西蘭為其主要的商業化栽培國；宮燈百合為台灣新興之球根花卉，種球主要由紐西蘭進口，目前於台灣之清境、埔里和后有零星栽培。

投稿日期：2017 年 10 月 10 日；接受日期：2017 年 11 月 28 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。

國際間已記錄可感染宮燈百合之病毒種類為胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV)，引起植株矮化及葉片壞疽條斑病徵 (stunt and necrotic streak) (Shiota & Uematsu 1998)。宮燈百合及火焰百合 (又名嘉蘭) 分類上原屬於百合科 (Liliaceae)，但依據被子植物 APG IV 分類法 (Angiosperm Phylogeny Group)，二者在基因上之親緣關係，進一步分類至秋水仙科 (Colchicaceae) (<https://zh.wikipedia.org/wiki/Colchicaceae>)；但中國大陸及台灣之分類仍將火焰百合及宮燈百合歸類於百合科。

嘉蘭條斑嵌紋病毒 [*Gloriosa stripe mosaic virus*; GSMV; 國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) code: 00.057.0.01.026] 為已知之 *Potyvirus* 屬病毒成員，此病毒首次於 1974 年由德國學者 (Koenig & Lesemann 1974) 於火焰百合 (嘉蘭) 上 (*Gloriosa rothschildiana*) 所報導。之後於荷蘭 (Pham *et al.* 2011) 和美國 (Mollov *et al.* 2017) 也在火焰百合上發現有 GSMV。Mollov *et al.* (2017) 發現 GSMV 引起火焰百合 (*Gloriosa superba* 'Rothschildiana') 全株葉片嵌紋和黃化條斑，而 Wang *et al.* (2007) 新命名之火焰百合嵌紋病毒 (*Glory lily mosaic virus*; GLMV; GenBank EU250360) 的病毒分離株，經由 Pham *et al.* (2011) 報導由病毒核酸序列分析比對結果顯示，GLMV 應屬於 GSMV 病毒之成員，二者為相同病毒。目前火焰百合 (*Gloriosa* spp.) 上已記錄的病毒有 3 種 (Araki *et al.* 1985)，包括 CMV、*Gloriosa fleck virus* (GIFV) 和 GSMV。而 GSMV 和 CMV 為宮燈百合和火焰百合上發生的共同病毒。

近年來依據 ICTV (<https://talk.ictvonline.org>) 所公布的 *Potyvirus* 屬病毒分類標準：*potyvirus* 病毒型態為長絲狀，病毒顆粒大小約 680–900 nm；具有分子量約 30–47 kDa 的蛋白質外鞘，其基因體乃由分子量大小約 9.7 kb 的單股 RNA (positive sense ssRNA) 所組成。*Potyvirus* 屬病毒整個基因體僅具有一個轉譯架構 (open reading frame; ORF)，其基因表現時先合成一條分子量約 340–368 kDa 的大蛋白 (polyprotein)，再由病毒本身所合成的蛋白酶

進行蛋白質裂解成多個具有不同功能之蛋白產物，包括 P1-Pro (protein 1 protease)、HC-Pro (helper component protease)、P3 (protein 3)、6k1 (6-kDa peptide 1)、CI (cytoplasmic inclusion)、6k2 (6-kDa peptide 2)、NIa-Pro (nuclear inclusion A protease)、NIb (nuclear inclusion B) 和 CP (coat protein)。

Potyvirus 屬病毒分類上可由病毒顆粒型態、媒介昆蟲種類、血清親緣關係和核酸分子特性等方面鑑定之；ICTV 對於 *Potyvirus* 屬病毒的種 (species) 分類界定，主要依據：(1) 完整大蛋白的核苷酸相同度小於 76%、胺基酸小於 82% 者；(2) 若採用特定蛋白區域的核苷酸相同度，則於 P1 區者小於 58%，於其他區者則小於 74–78%；(3) CP 的核苷酸相同度小於 76–77%、胺基酸小於 80% 者 (Adams *et al.* 2005)。此外，*Potyvirus* 屬病毒也可依據其 3' 端非轉譯區 (3'-noncoding region; 3'-NCR) 之核苷酸序列比對，在高於 80% 相同度者鑑定為相同種的 *potyvirus* 病毒 (Frenkel *et al.* 1989)。

宮燈百合為台灣新興的球根花卉，國內主要以種球進口生產切花，以其花朵金黃色彩加上切花造型特性，常被利用於花藝設計使用。宮燈百合可用種子和種球做繁殖，種球有兩個芽點可產生兩個新子球；近年來有部分國內花農可以自行成功繁殖宮燈百合。目前種球主要以進口輸入，對於可能隨種球進口而輸入國內之病毒種類，有必要建立自主檢測能力以因應。本研究以進口的宮燈百合種球為樣品，分別以核酸分子定序及血清學免疫法鑑定 GSMV 發生於宮燈百合上。並進一步完成其對應大蛋白的全長度核酸定序，依據核甘酸與胺基酸序列分析，以確認其為 *Potyvirus* 屬的 GSMV 病毒成員；利用細菌合成系統表現病毒 CP 做為抗原，以製備可供檢測 GSMV 的多元抗體；設計可鑑別宮燈百合及火焰百合 GSMV 分離株的反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 檢測用引子對等。本研究為首次紀錄由宮燈百合上檢出 GSMV，並完成其全長度大蛋白的核酸序列定序而登錄於 GenBank 者，已研製的

多元抗體和核酸引子對均已實用於進口宮燈百合之病毒監測。

材料與方法

材料來源與保存

本研究採用紐西蘭進口的宮燈百合球根種植後新發之葉片組織，於 RT-PCR 中，可與 *Potyvirus* 屬簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ (5'ATGATHGARKCNTGGGG3'/5'GCGGC-CGCTTTTTTTTTTTTTT3') (Pappu *et al.* 1998; Chen *et al.* 2006) 反應而呈現特定核酸片段產物的葉片組織進行試驗，並將檢出有病毒正反應的罹病葉片浸漬於 50% (v/v) 甘油中，保存於 -20°C 下供後續試驗所需。

宮燈百合材料分別於 2005 年和 2008 年所收集保存，罹病植株葉片呈現輕微嵌紋或不明顯徵狀；另以 2015 年採集之火焰百合做比較試驗，罹病植株葉片出現嵌紋或褐化條斑。

病毒 3' 端核酸片段之增幅、選殖與定序分析

本研究之受測樣品，包括宮燈百合及火焰百合病毒罹病組織，分別以 RT-PCR 法進行其 3' 端核酸片段之增幅後，選殖特定核酸片段進行核苷酸定序分析，以取得不同病毒分離株之 CP 核酸序列。採用之反應條件詳述如下。

單步驟 RT-PCR 法：取 0.1 g 之受測葉片，加入液態氮研磨均勻後，依據市售的植物全量核酸純化試劑組 (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) 之步驟，進行供試植物全量核糖核酸 (RNA) 之萃取。以純化所得之 RNA 為模板，使用可增幅 *Potyvirus* 屬病毒核酸 3' 端 (3'-terminal region) 約 1.3 kbp 之簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ (Pappu *et al.* 1998; Chen *et al.* 2006) 進行單步驟 RT-PCR 反應。

RT-PCR 依據試劑組 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 之配方，於每一 25 µL 反應液中分別加入 1 µL 之全量 RNA、12.5 µL 之 2× Reaction Mix、0.5 µL 之 SuperScript III RT-/Platinum Taq Mix、各 1 µL 之 10 µM 上游和下游引子和 9 µL 之 DEPC-treated water。所有試劑混合均勻後，於熱循環反應儀 (T3000 Thermocycler,

Biometra, Göttingen, Germany) 中進行。設定反應程序為：50°C 下進行反轉錄 30 min、94°C 變性 1 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 1 min、52°C 下煉合 1 min 30 s、72°C 下聚合 2 min，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

核酸片段選殖和核苷酸序列分析：經由引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ 於 RT-PCR 反應中所增幅出預估 1.3 kbp 的核酸片段，選殖於 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) 載體上，篩選出含有此特定嵌入序列 (insert sequence) 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，進行核酸選殖與定序分析，所得序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Bethesda, MD, USA) 分析軟體進行分析，並與美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 已登錄的 GSMV 和 *Potyvirus* 屬病毒之 CP 核苷酸和胺基酸序列，以及 3'-NCR 序列進行比對分析。

病毒大蛋白之全長度核酸序列選殖及解序

將 2005 年所收集的宮燈百合病毒 CB 分離株，以其罹病組織所抽取之全量核酸為來源，先以 Poty2/Oligo-dT₍₁₄₎ (5'GCGGGATCCGTNT-GYGTNGAYGAYTTTTYAAAYAA3'/5'GCGGC-CGCTTTTTTTTTTTTTT3') 引子對所增幅出之病毒 3' 端約 2.0 kbp 核酸片段已知序列為基礎，與 GenBank 資料庫上之植物病毒序列比對結果，其和 *Potyvirus* 屬成員 *Chilli veinal mottle virus* (CVMV) (NC_005778 和 AB012221) 的核苷酸序列相似度最高 (比對當時為 2005–2006 年期間，尚未有 GSMV 的核酸序列公告)，乃先以 CVMV 已知之全長度基因體為參考基礎，設計可包含全長度大蛋白核苷酸序列之相關引子對，以 RT-PCR 法配合不同引子對，分不同片段進行 CB 分離株全長度核酸序列之選殖與定序 (圖 1A)。所設計使用之引子對組合包括 5'CBu/5'CB1761d、

CB1590u/CB4139d、CB3816u/CB7016d、CB6824u/CB7721d、Poty2u/Oligo-d(T)₁₄，各引子之序列詳如圖 1B。單步驟 RT-PCR 增幅之黏合溫度，除 5'CBu/5'CB1761d 於 45°C 進行外，其他各引子對之黏合溫度為 50–52°C。

接近 CB 基因體 5' 端之核苷酸片段，乃參考由 CB1590u/CB4139d 引子對所增幅出之 2.5 kbp 核酸片段序列 (圖 1A) 與當時 GenBank 上已登錄者相同度最高之 3 種 *Potyvirus* 屬病毒的核苷酸序列，分別為 CVMV (NC_005778)、*Plum pox virus* (PPV) (NC001445) 和 *Turnip mosaic virus* (TuMV) (AB252131)；以此 3 種病毒的 5' 端序列設計簡併式引子對 5'CBu/5'CB1761d，於黏合溫度為 45°C 下進行單步驟 RT-PCR 增幅，預估增幅出之核酸片段大小約 1.76 kbp。

針對全長度基因體之選殖，將上述各不同引子組增幅所得之核酸片段，構築於 TOPO TA-PCR II 載體上 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)，經篩選出含有特定片段之嵌入序列選殖株各 3 個，進行核苷酸定序分析。病毒之 5' 端核苷酸序列，將不採計簡併式引子 5'CBu 序列所黏合處之 21 個核苷酸。

不同 GSMV 分離株 CP 之類緣關係分析

本研究以 RT-PCR 法，分別由宮燈百合和火焰百合上之 *Potyvirus* 屬病毒分離株，包括 CB 及其他 2 個宮燈百合分離株 (CB4 和 CB18)，和 3 個火焰百合分離株 (GL2、GL3 和 GL4)，以 *Potyvirus* 屬病毒的簡併式引子對 HRP 5/Oligo-d(T)₁₄ 進行其 3' 端約 1.3 kbp 之核酸片段增幅，

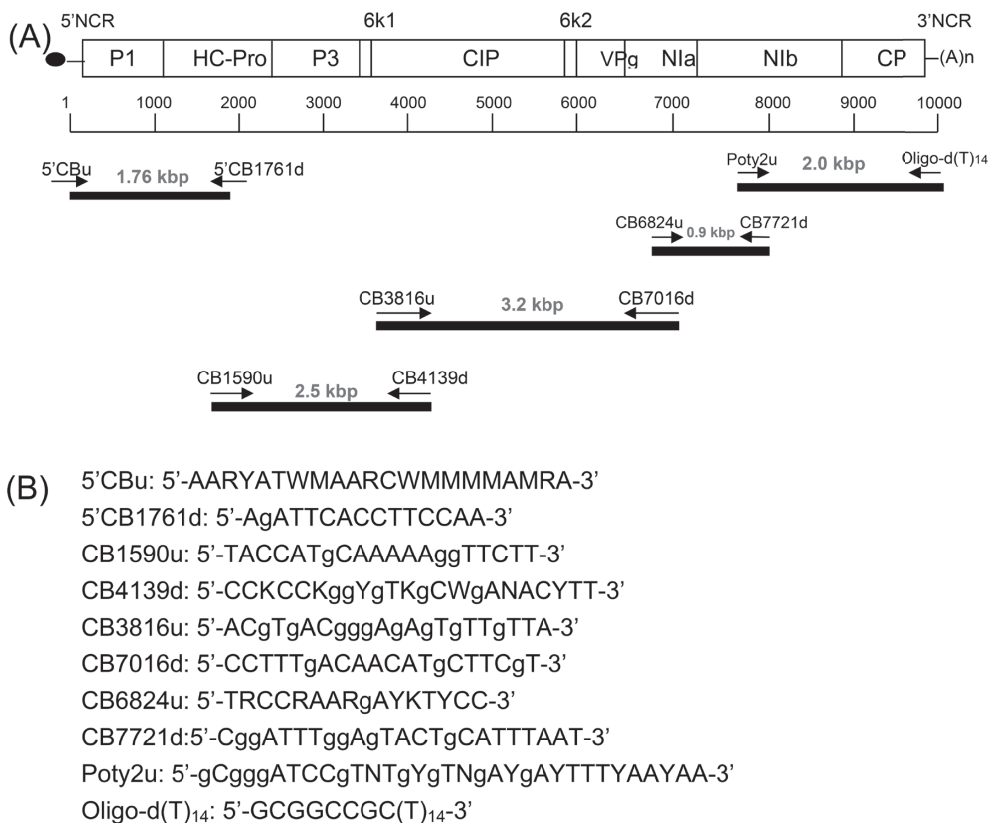


圖 1. GSMV 全長度基因體之增幅與構築策略。

Fig. 1. The strategy for determination of the complete genomic nucleotide sequence of the *Gloriosa stripe mosaic virus* CB isolate (GSMV-CB). (A) Schematic representation of the genetic structure of GSMV-CB and the overlapped cDNA fragments amplified from reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) by the primers. Black bars represent length of amplified DNA fragments. (B) Sequences of the primers used in RT-PCR.

選用對應 CP 區域之核苷酸和胺基酸序列，以及 3'-NCR 核苷酸序列與 GenBank 上所登錄之不同寄主來源的 GSMV 分離株，以 Vector NTI Suite 分析軟體進行序列相同度 (% identity) 分析；另進行類緣關係分析 (phylogenetic analysis)，以 CVMV (NC_005778) 和 TuMV (AB252131) 做為外群 (outgroup)，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，以 Neighbor-Joining (NJ) 方法建構親緣關係樹，並結合 Bootstrap resampling method (BRM) 法 (Felsenstein 1985; Thompson *et al.* 1997) 評估關係樹分群的統計顯著性。

GSMV 鑑別性引子對之設計與測試

依據 CB 分離株之 CP 核苷酸序列設計 3 組引子對，分別有 3 條不同上游引子 GSMV715u (5'TGTGGATGCTGGTGTCT3')、GSMV660u (5'CAG GCC CACAGGCACA3') 和 GSMV500u (5'GCCAAACCAAGATCGA3') 搭配共同下游 GSMVd (5'TTCCTGTGTTCTACCTT3') 引子。取宮燈百合和火焰百合罹病組織，純化其全量核酸做為模板進行單步驟 RT-PCR 反應。反應條件為 50°C 下進行反轉錄 30 min、94°C 變性 2 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 40 s、52°C 下煉合 40 s、72°C 下聚合 40 s，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

各組引子對可增幅出之核酸片段產物預估分別是 GSMV715u/GSMVd 為 715 bp、GSMV660u/GSMVd 為 660 bp 和 GSMV500u/GSMVd 為 500 bp，依據預估之產物評估各組引子對之鑑別性檢測效果。

CB 分離株 CP 表現及多元抗體製備

依據 CB 3' 端核酸序列定序結果，設計可增幅其全長度 CP 核苷酸序列之引子對 CBCPEu (5'GTTTATCATATGTCTGGGTCTAGTGTG-GATGCT3'；劃底線者為 *NdeI* 切位) 和 CBCPED (5'CTCATATAATACTACTAACACACTCGAGT-CACAA3'；劃雙底線者為 *XhoI* 切位)。以宮燈

百合 CB 罹病組織全量 RNA 為模板，參照上述 RT-PCR 反應條件，以此引子對，於 52°C 下煉合 1 min 30 s，進行 30 個 PCR 循環增幅。

將增幅所得之 CB CP 核酸片段以 *NdeI* 和 *XhoI* 切割，剪接於同樣經 *NdeI* 和 *XhoI* 切割之 pET28b(+) 載體 (Novagen, Inc., Madison, WI, USA)，並轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3)。轉型株以 M9 培養基培養，並以 1 mg mL⁻¹ 之 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質之表現 (Li *et al.* 1998)。培養之菌液以 5,900× g 轉速離心 10 min 後，沉澱物以 0.5 M Tris-EDTA (pH 8.0) 緩衝液溶解均勻，並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，再經西方墨點法以市售 *Potyvirus* 屬單元抗體 (Agdia, Inc., Elkhart, IN, USA) 確認 CB CP 抗原之表現。

進一步選用確定有表現 CB CP 之選殖株進行大量表現蛋白之誘導與純化 (Li *et al.* 1998)，將純化之表現蛋白濃縮為 1 mg mL⁻¹ 以做為抗原，並送交濁水溪生物科技有限公司 (桃園市，台灣) 進行每週一 1 次、連續 4 wk 的兔免疫注射以製備多元抗體。

抗血清免疫檢測分析

間接式-酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)：本試驗參考以往報告進行之 (Clark & Adams 1977; Chang *et al.* 1988)，以 indirect ELISA 法進行。取 0.1 g 之受測樣品組織，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 ELISA 反應盤內，每樣品加 2 孔 (100 μL/孔) 為 2 個重複，置於 37°C 定溫 3–4 h 進行覆膜反應 (coating reaction)，然後以 1× PBST (Phosphate buffered saline with Tween-20) 緩衝液 (137 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 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 h；爾後以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次，再加入已稀釋 6,000× 之山羊抗兔二次抗體 (goat anti-rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, USA) (100 μL/孔)，置於 25°C 之定溫箱反應 2–3 h；最後再以 1× PBST 緩衝液

沖洗 4 次後，再以 150 μL /孔之比例加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-NPP) (Amresco, Solon Ind., Solon, OH, USA) 進行呈色反應。反應 30 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，做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，判讀為正反應。

西方墨點法：取 0.1 g 受測樣品之組織，置於 1.5 mL 微量離心管內，加入液態氮研磨均質，加入 200 μL 樣品處理液混勻 (Chen & Chiang 2017)。再加入 200 μL 之 LDS 溶液 (Laemmli 1970) 混勻，於沸水中悶熱 3–5 min，以 5,900 \times g 離心 5 min 後取上清液進行電泳分析。處理後之樣品經 SDS-PAGE 後，取膠體轉漬於聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride; PVDF) 膜 (Millipore Co., Burlington, MA, USA)，再與受測之病毒抗體進行反應。

CB 多元抗體應用於宮燈百合和火焰百合罹病株之檢測

選用進口宮燈百合和田間火焰百合，採取其葉片分別以 indirect ELISA 及西方墨點法與自製 CB 多元抗體進行反應，流程詳如前述。於 indirect ELISA 法中，本試驗選用其他種 potyvirus 病毒罹病組織進行檢測試驗 (表 1)，以評估本自製多元抗體之檢測專一性。

結果

宮燈百合 CB 分離株之大蛋白全長度核酸序列分析

本研究以宮燈百合 CB 罹病葉片純化之全量核酸為模板，先以 Poty2/Oligo-dT₍₁₄₎ 引子對進行 RT-PCR，於電泳分析中獲得與預估值相符合約 2 kbp 核酸片段，經選殖與定序後確定有一個轉譯架構 (ORF)，為一種具有 Potyvirus 屬病毒基因體 3' 端特質之核酸片段。進一步就 CB 分離株全長度核酸序列之選殖與定序結果，在不採計 5' 端由簡併式引子 5'CBu 序列所黏合處之 21 個核苷酸後，共解得 9,455 個核苷酸，已登錄於 GenBank 取得登錄序號為 EF427894。

表 1. 宮燈百合 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) 多元抗體於間接酵素連結免疫吸附法中檢測不同 Potyvirus 屬病毒之效果。

Table 1. Reactions of polyclonal antibody against *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) with different potyviruses in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Antigen ^z	ELISA reading ($A_{405\text{nm}}$) ^y
GSMV-CB	2.40
GSMV-CB4	2.25
GSMV-CB18	3.26
GSMV-GL1	0.56
GSMV-GL2	3.49
GSMV-GL3	3.12
GSMV-GL4	1.15
TuMV	1.96
BICMV	0.09
BYMV	0.15
CLLV	0.13
DsMV	0.08
KoMV	0.09
LiMV	0.28
PVY	0.08
ZYMV	0.32
D-CK	3.07
2H-CK	0.20

^z Antigens of GSMV-CB isolates obtained from diseased Christmas bells tissues and GSMV-GL isolates from diseased gloriosa. Different Potyvirus isolates including *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Black cowpea mosaic* (BICMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Calla lily latent virus* (CLLV), *Dashen mosaic virus* (DsMV), *Konjac mosaic virus* (KoMV), *Lily mottle virus* (LiMV), *Potato virus Y* (PVY), and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) were used. The bacterial expressed protein (D-CK) was used as positive control and healthy Christmas bells tissues (H-CK) was used as negative control antigens.

^y The absorbance values ($A_{405\text{nm}}$) are an average of two replicate wells. Those reactivities lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered as negative reactions.

分析所解得的 9,455 個核苷酸序列之 CB 分離株基因體結構，其包含有部分的 5' 端非轉譯區 (5'-NCR) 約 111 個核苷酸和 3'-NCR 的 188 個核苷酸；含有一個大蛋白轉譯架構，蛋白轉譯起始位置為核苷酸 (nucleotide) AUG triplet，由 9,156 個核苷酸對應產生一條含 3,052 個胺基酸的大蛋白；對應不同功能蛋白之核酸序列長度 (核苷酸/胺基酸) 分別為：P1 蛋白 (843/281)、

HC-Pro 蛋白 (1,371/457)、P3 蛋白 (1,041/347)、6k1 蛋白 (153/51)、CI 蛋白 (1,929/643)、6k2 蛋白 (159/53)、NIa-VPg 蛋白 (570/190)、NIa-Pro 蛋白 (726/242)、NIb 蛋白 (1,566/522)、CP 蛋白 (798/266)。因此，對應 CP 有 798 個核苷酸，可轉譯出 266 個胺基酸，預估其分子量約為 29.3 kDa，CP 起始位置第 6–8 個胺基酸為 DAG triplet，乃 *Potyvirus* 屬病毒可被蚜蟲傳播之分子證據 (Atreya *et al.* 1991)。

依據 *Potyvirus* 屬病毒胺基酸序列特性 (Ward *et al.* 1992; Adams *et al.* 2005) 歸納本研究所得之 GSMV-CB 分離株基因體對應的蛋白分解酶辨識位址 (protease recognition site)，分別是：P1 protease 為 LRQY/S、HC-Pro protease 為 YRVG/G；NIa protease 於 P3/6k1、6k1/CIP 及 CIP/6k2 之辨識位址分別為 VGHQ/D、VGHQ/S 及 VRHQ/S，

於 6k2/VPg、VPg/NIa、NIa/NIb 及 NIb/CP 之辨識位址分別為 VQHQ/G、VGHE/A、VECQ/A 及 VYHQ/S。上述針對 CB 分離株的基因體分析結果，均符合 *Potyvirus* 屬病毒的特性。

不同 GSMV 分離株之 CP 核酸序列分析

本研究之宮燈百合病毒分離株 (CB、CB4 和 CB18)，其與 GenBank 上已登錄之火焰百合 (GSMV, EU042761; Pham *et al.* 2011) 的 CP 核苷酸和胺基酸序列相同度分別為 94.5–95.5% 和 91.4–94.0% 之間 (表 2)，而 3'-NCR 核苷酸序列相同度為 87.7–88.2%。而由田間採集的 3 個火焰百合病毒分離株 (代號 GL2、GL3 和 GL4)，其和 GSMV (EU042761) CP 核苷酸和胺基酸序列之相同度為 82.6–84.0% 和 86.5–89.8% 之間；而 3'-NCR 核苷酸序列相同度為 82.4–85.0% (表 2)。

表 2. 火焰百合 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) Pham 分離株與其他已知 GSMV 病毒之鞘蛋白核酸和 3' 端非轉譯區序列相同度比較。

Table 2. Comparison of the identities of nucleic acid sequences of the coat protein (CP) and 3'-noncoding region (3'-NCR) of the *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) Pham isolate from gloriosa with those of other known GSMV isolates available in GenBank.

Source ^y	Acc. no.	% identity of ^z		
		CP-nt	CP-aa	3'-NCR
Gloriosa-Pham	EU042761	100.0	100.0	100.0
Christmas bells CB	EF427894	94.5	91.4	87.7
Christmas bells CB4	KT764122	95.5	94.0	88.2
Christmas bells CB18	KT764123	95.5	93.6	88.2
Gloriosa GL2	KT764120	82.7	87.2	82.4
Gloriosa GL3	KT764124	84.0	89.8	85.0
Gloriosa GL4	KT764121	82.6	86.5	82.9
Gloriosa MD1	KT602853	93.6	90.6	N
Gloriosa MD2	KT602854	92.1	89.8	N
Gloriosa MD3	KT602855	82.5	86.5	N
Gloriosa-Tw ^x	EU250360	82.8	87.6	81.8
CVMV ^w	NC_005778	60.3	60.6	38.5
PPV	NC_001445	54.8	51.7	42.6
TuMV	AB252131	57.0	54.5	41.3

^z Percent identities (%) of the respective nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences were analyzed by the Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Bethesda, MD, USA). N, there is no available nucleotide sequences of 3'-noncoding region (3'-NCR) in GenBank.

^y The sequence of GSMV isolate (EU042761, Pham *et al.* 2011) was used for leader comparison. Isolates collected from Christmas bells were CB, CB4 and CB18; from gloriosa were GL2, GL3 and GL4 in this study; MD1–MD3 were gloriosa isolates reported by Mollov *et al.* (2017).

^x The Glory lily mosaic virus (synonym to GSMV) collected from gloriosa was submitted directly to GenBank by Wang *et al.* (2007).

^w Three *Potyvirus* isolates, *Chili veinal mottle virus* (CVMV), *Plum pox virus* (PPV), and *Turnip mosaic virus* (TuMV) available in GenBank were used for comparison.

但若以 CB 分離株序列為主進行之相同度分析，則與本研究之宮燈百合和火焰百合，以及 GSMV (EU042761) 分離株間之 CP 胺基酸序列和 3'-NCR 核苷酸序列相同度分別高於 91.0% 和 85.0% 以上 (結果未出示)。由 *Potyvirus* 屬病毒之核酸分子鑑定標準，此等核酸分子分析結果顯示，本研究所獲得之宮燈百合和火焰百合病毒分離株均符合 *Potyvirus* 屬之 GSMV 成員。

本研究由宮燈百合和火焰百合分離所得之病毒核酸序列，均已登錄於 GenBank 取得序號分別為宮燈百合 CB (EF427894)、CB4 (KT764122)、CB18 (KT764123)；火焰百合 GL2 (KT764120)、GL3 (KT764124) 及 GL4 (KT764121)。而本研究之宮燈百合和火焰百合於 CP 胺基酸序列高於 91%，可藉由 CP 區域設計可同時或鑑別性檢測此兩種寄主來源 GSMV 之引子對，應用於 RT-PCR 檢測法篩檢 GSMV 病毒。

不同 GSMV 分離株 CP 之類緣關係分析

由本研究所得之不同宮燈百合和火焰百合 GSMV 分離株，以其全長度 CP 之胺基酸序列進行比對以及類緣關係分析。由其胺基酸比對 (alignment) 結果顯示 (圖 2)，本研究的 3 個宮燈百合分離株 (CB、CB4 和 CB18) 與荷蘭學者發表的火焰百合分離株 (EF042761) (Pham *et al.* 2011) 之間，在 CP 胺基酸起始第 20、22、42、61 和 91 的胺基酸種類屬同一類型，而與其他火焰百合分離株者不同。此不同位置之胺基酸種類，來自宮燈百合 GSMV 分離株者分別為 Serine^{20th} (S)、S^{22nd}、Alanine^{42nd} (A)、Glutamate^{61st} (E)、Leucine^{91st} (L)，此與大部分的火焰百合 GSMV 分離株為 Glycine^{20th} (G)、A^{22nd}、Threonine^{42nd} (T)、Glutamine^{61st} (Q)、S^{91st} 而有所差異 (圖 2)。

在類緣分析的樹狀圖上，以 CVMV 和 TuMV 做為外群比對下，宮燈百合及火焰百合來源的病毒分離株則同屬於 GSMV 分群。然而在此 GSMV 類群內，進一步可發現本研究的 3 個宮燈百合分離株與荷蘭學者發表的火焰百合分離株 (EF042761) 之類緣關係較相近，屬於同一演化分群；而與本研究的火焰百合分離株 (GL2, GL3, GL4) 位於不同演化分群 (圖 3)。

宮燈百合 GSMV 專一性引子對及 RT-PCR 檢測

本研究依據 CB 分離株的 CP 核苷酸序列所設計的 3 組簡併式引子對 (上游引子分別為 GSMV715u、GSMV660u 及 GSMV500u，搭配共同下游 GSMVd 引子)，於 RT-PCR 反應中，GSMV660u/GSMVd 和 GSMV500u/GSMVd 的組合，均可同時檢測出宮燈百合及火焰百合上之 GSMV，核酸片段產物分子量分別為 660 bp 和 500 bp (圖 4)；而引子對 GSMV715u/GSMVd 僅可檢測到宮燈百合 GSMV 分離株之 715 bp 核酸片段產物，而對火焰百合 GSMV 分離株則無預期的 715 bp 片段被增幅出，雖有大小約 100 bp 屬於植物葉綠體的非專一性條帶 (圖 4)，但不影響判讀結果。本結果顯示，GSMV715u/GSMVd 引子對可應用於宮燈百合和火焰百合 GSMV 之鑑別性檢測。

宮燈百合 GSMV-CB 分離株 CP 表現及其多元抗體之檢測效果評估

宮燈百合 CB 分離株之 CP 表現蛋白 (BEP-CB)，為預估包含有 287 個胺基酸的融合性蛋白 (CB CP 的 N 端外加有 pET28b 表現載體的 21 個胺基酸)，於 SDS-PAGE 電泳分析中可見 BEPCB 融合性表現蛋白之分子量約為 31.6 kDa，與預估值相符且為不帶有 CB 核酸嵌入序列的 pET28b 表現載體所有 (圖 5A)。於西方墨點法中，市售 *Potyvirus* 屬病毒的單株抗體 (monoclonal antibody) 可與 BEPCB 表現蛋白產生正反應 (圖 5B)，顯示本研究之 BEPCB 表現蛋白具有 *Potyvirus* 病毒之抗原特性；以 BEPCB 表現蛋白為抗原所製備之多元抗體，可與其同源的 BEPCB 表現蛋白之 31.6 kDa 產生正反應 (圖 5C)。

進一步將 GSMV-CB 多元抗體與宮燈百合和火焰百合不同 GSMV 罹病組織進行免疫反應，均可於預估病毒 CP 分子量位址 (約 29.3 kDa) 產生正反應，然而罹病組織均可見有小於 29.3 kDa 的蛋白條帶產生 (圖 6)。GSMV-CB 多元抗體並不與宮燈百合和火焰百合的健康組織對照品產

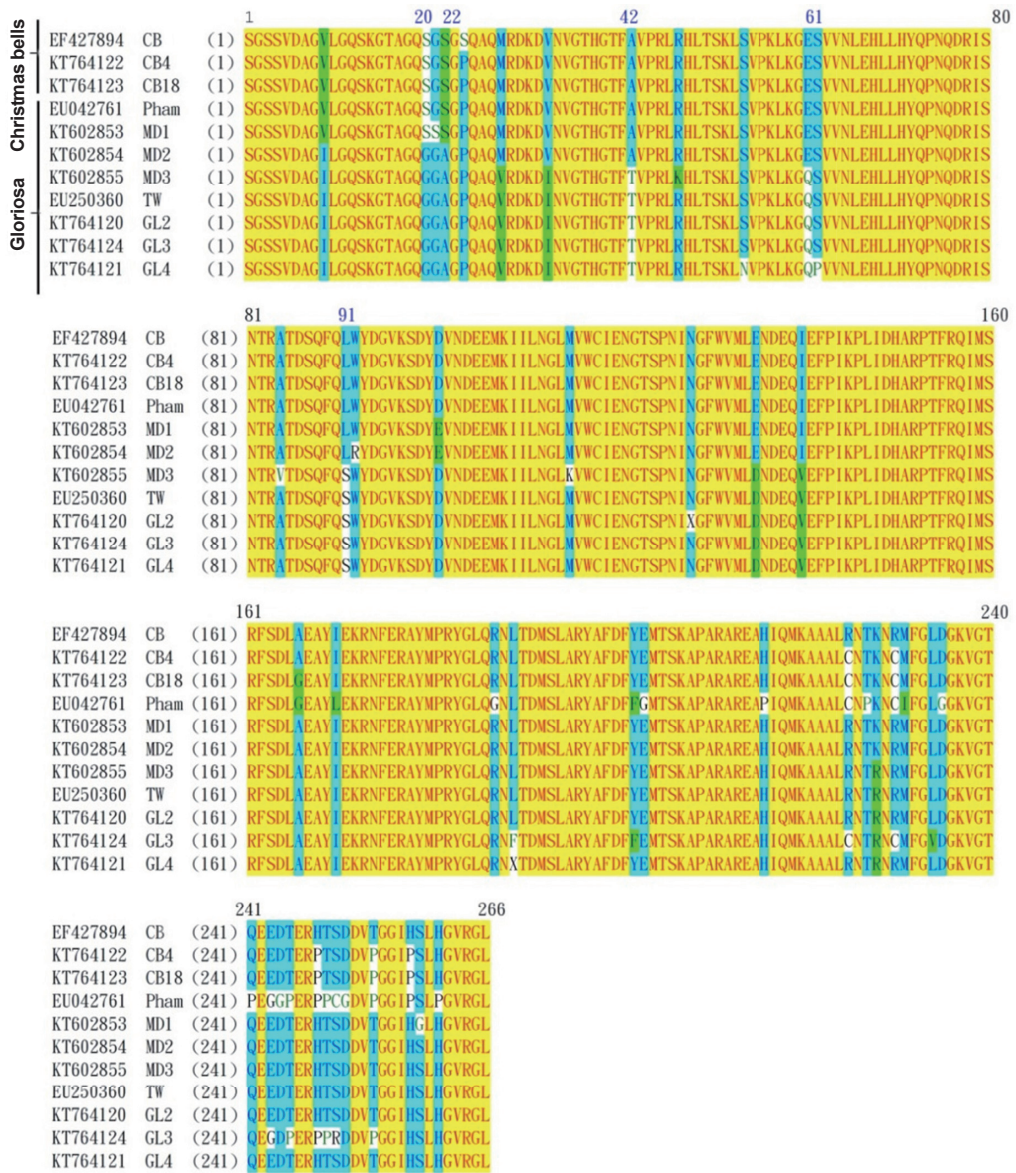


圖 2. 不同 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) 分離株鞘蛋白胺基酸序列比對圖。

Fig. 2. Alignment of the amino acid sequences of coat proteins of different *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) isolates. The coat protein regions of 11 GSMV isolates from Christmas bells and gloriosa were compared. Isolates collected from Christmas bells were CB, CB4, and CB18; from gloriosa were GL2, GL3, and GL4 in this study; MD1–MD3 were gloriosa isolates reported by Mollov *et al.* (2017). Tw was the *Glory lily mosaic virus* (synonym to GSMV) collected from gloriosa and submitted directly to GenBank by Wang *et al.* (2007). The different amino acids at 20th, 22nd, 42nd, 61st and 91st among isolates of Christmas bells and Gloria were shown.

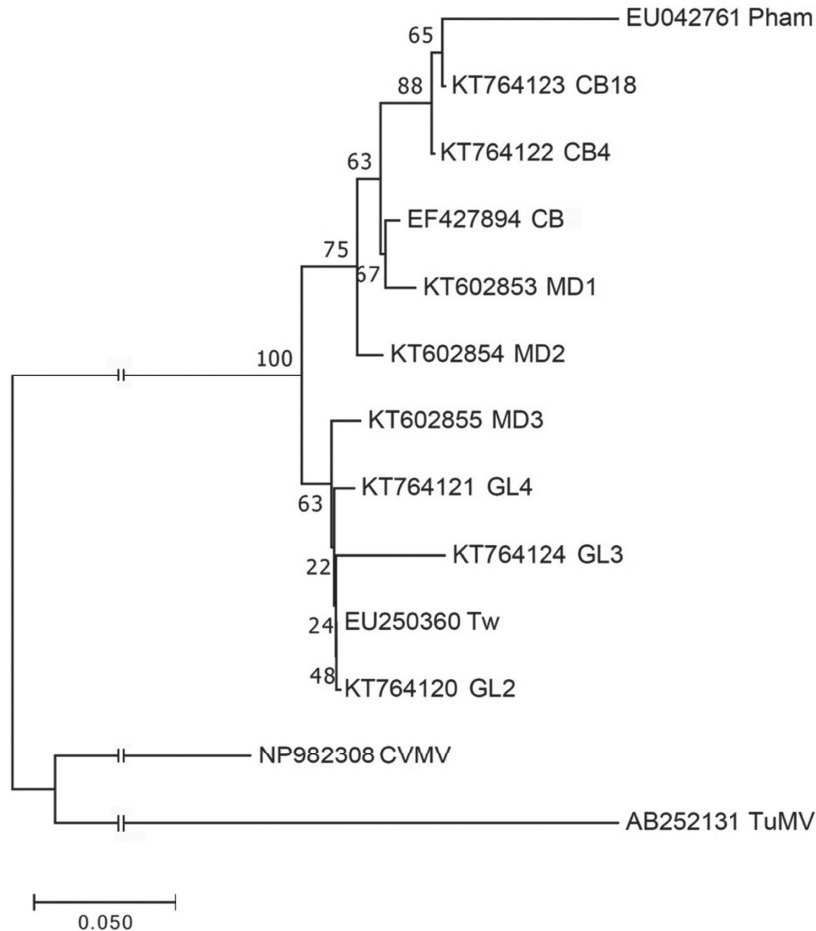


圖 3. 不同寄主來源 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) 分離株之類緣分析。

Fig. 3. A phylogram derived from the analysis of genetic distances based on the amino acid sequences of the coat proteins of 11 isolates of *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV). The tree was constructed using the neighbour-joining (NJ) algorithm with the bootstrap resampling method (1,000 random resamplings), using PAUP 4.0. Horizontal branch length is drawn according to the scale bar indicating 50 substitutions per 1,000 amino acid positions per site. Isolates collected from Christmas bells were CB, CB4, and CB18; from gloriosa were GL2, GL3, and GL4 in this study; MD1–MD3 were gloriosa isolates reported by Mollov *et al.* (2017). Tw was the *Glory lily mosaic virus* (synonym to GSMV) collected from gloriosa and submitted directly to GenBank by Wang *et al.* (2007). Sequences of *Chilli veinal mottle virus* (CVMV) and *Turnip mosaic virus* (TuMV) isolates were used as outgroup elements.

生反應，在此兩種寄主上具有對 GSMV 病毒的免疫檢測效果。

本研究結果顯示，BEPCB 表現蛋白除可做為 GSMV 免疫檢測之正對照品外，以其為抗原所製備出之多元抗體，在西方墨點法中可成功應用於宮燈百合和火焰百合 GSMV 罹病組織的檢測 (圖 6)。

於 indirect ELISA 反應中，CB 多元抗體對

於其同源抗原之 BEPCB 表現蛋白的反應值高於 3.0，為正反應讀值，且與宮燈百合和火焰百合罹病組織之讀值均為正反應值，介於 0.56–3.49 間 (表 1)。然而，CB 多元抗體於 indirect ELISA 中也可與 TuMV 產生高於 1.0 之正反應讀值 (表 1)，且進一步以西方墨點法檢測發現此多元抗體也會與 TuMV 的 CP 條帶產生正反應，但仍可依分子量大小與 GSMV-CB 做區分 (圖 6)。上述結

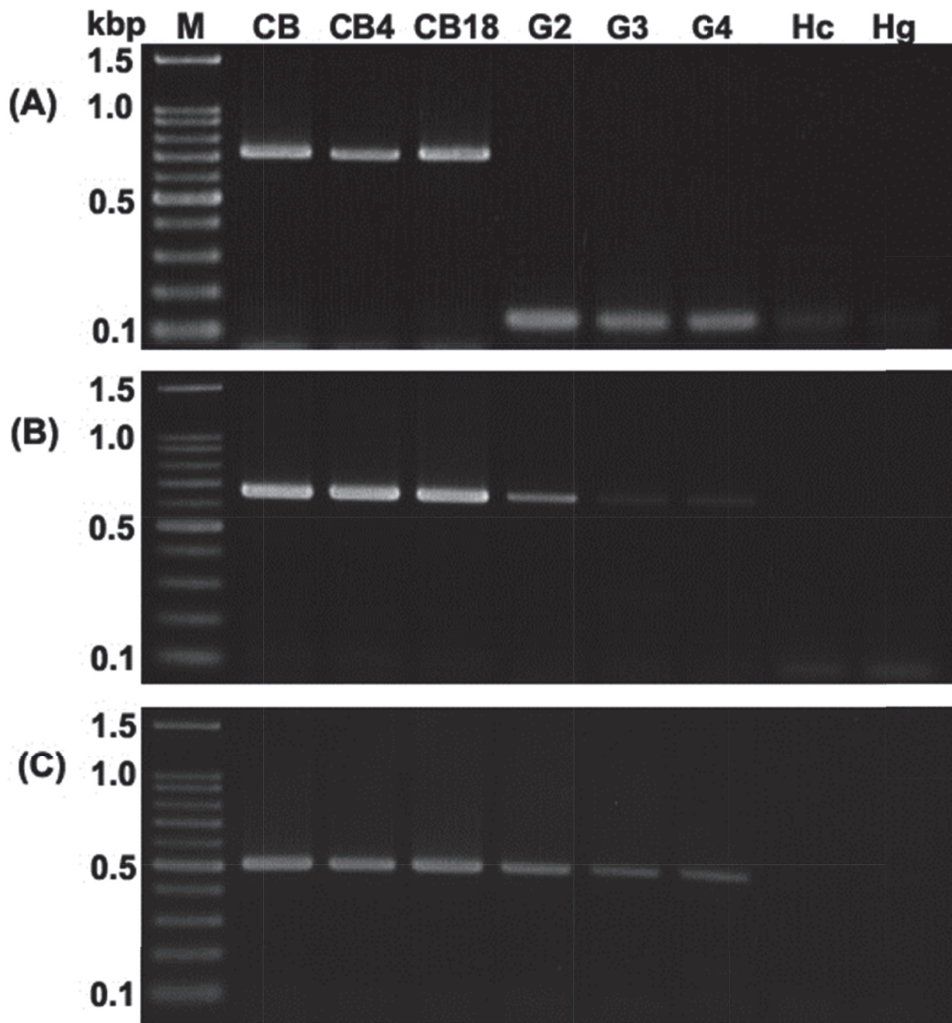


圖 4. GSMV 引子組對於 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) 不同寄主來源分離株之鑑別性檢測。利用 3 組引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 中進行宮燈百合和火焰百合 GSMV 罹病株之病毒核酸分子檢測。以 (A) GSMV715u/GSMVd、(B) GSMV660u/GSMVd 和 (C) GSMV500u/GSMVd 三組引子對增幅出之核酸片段產物大小，預估分別為 715 bp、660 bp 和 500 bp。行 M：100 bp DNA 標準標幟。行 CB、CB4 和 CB18：宮燈百合 GSMV 分離株；行 G2、G3、G4：火焰百合 GSMV 罹病組織；行 Hc：健康宮燈百合組織；行 Hg：健康火焰百合組織。

Fig. 4. The efficiencies of designed primer pairs for distinguishing the *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) isolates in reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Three primer sets were used for reaction with GSMV-infected Christmas bells and gloriosa. Lane M: 100-bp ladder DNA molecular marker; The predict amplified DNA fragments by three primer pairs were 715 bp by (A) GSMV715u/GSMVd, 660 bp by (B) GSMV660u/GSMVd, and 500 bp by (C) GSMV500u/GSMVd, respectively. Lane M: 100-bp ladder DNA molecular marker; lanes CB, CB4 and CB18: GSMV-CB isolates of Christmas bells; lanes G2, G3, and G4: GSMV isolates of gloriosas; lane Hc: healthy Christmas bells; and lane Hg: healthy gloriosa.

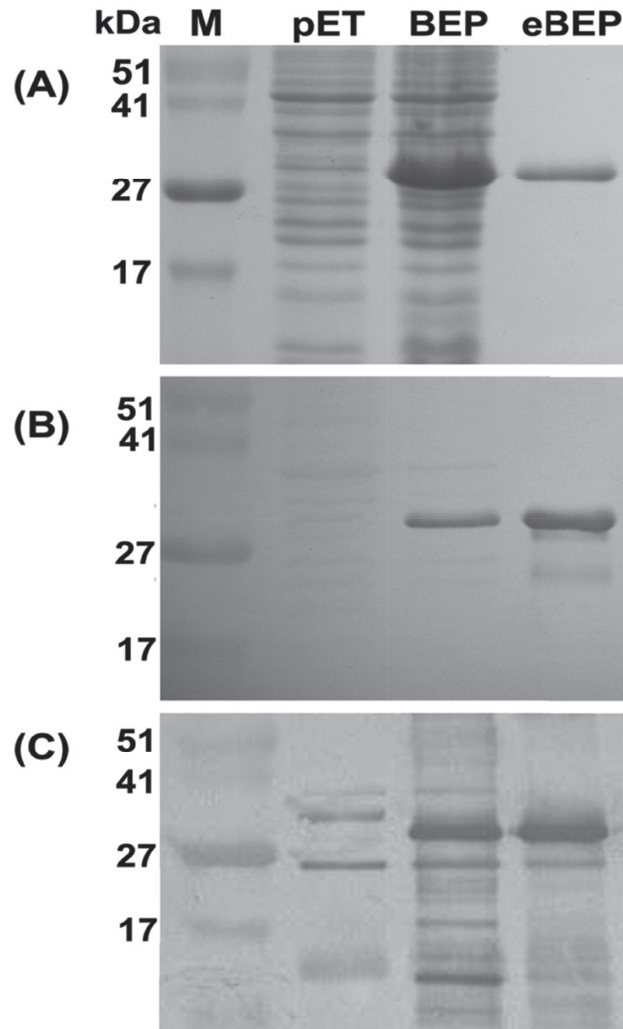


圖 5. 應用細菌大量表現的 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) CB 分離株融合性表現蛋白之 SDS-PAGE 電泳及西方墨點法分析。(A) GSMV-CB 融合性表現蛋白 (31.6 kDa) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與 (B) Agdia 公司出品之 *Potyvirus* 單株抗體和 (C) 自製之 GSMV-CB 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28b(+) 蛋白 (未帶有病毒鞘蛋白)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白。

Fig. 5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV)-CB. (A) A 31.6-kDa bacterial-expressed fusion protein of GSMV-CB was observed in the SDS-PAGE assay. The tested samples were reacted with (B) the purchased monoclonal antibody of *Potyvirus* from Agdia, and (C) the polyclonal antibody of GSMV-CB prepared in this study. Lane M: protein markers; lane pET: IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28b(+) without GSMV-CP insert; lane BEP: IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28b(+) with GSMV-CP insert; and lane eBEP: the purified bacterial-expressed GSMV-CP.

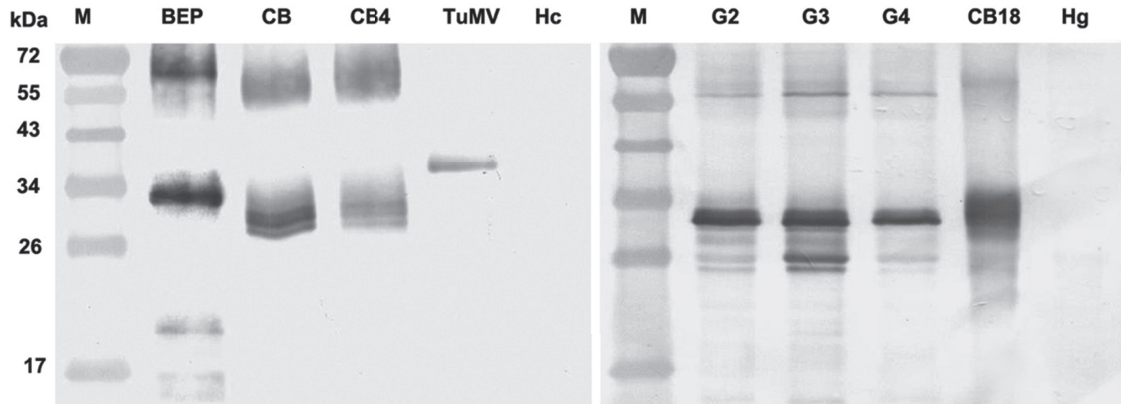


圖 6. 以西方墨點法應用 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) CB 多元抗體檢測宮燈百合和火焰百合之病毒發生。行 M：蛋白質分子量標幟；行 BEP：細菌表現之 CB 鞘蛋白；行 CB、CB4 和 CB18：宮燈百合 GSMV 罹病組織；行 G2、G3 和 G4：火焰百合 GSMV 罹病組織；行 Hc：健康宮燈百合；行 Hg：健康火焰百合。

Fig. 6. Western blotting for the detection of *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV)-infected tissues of Christmas bells and gloriosa, using the antiserum against the polyclonal antibody of GSMV-CB. Lane M: protein marker; lane BEP, IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28b(+) with GSMV-CP insert; lanes CB, CB4 and CB18: isolates of diseased Christmas bells; lanes G2, G3 and G4: isolates of diseased gloriosa; and lanes Hc and Hg: healthy tissues of Christmas bells and gloriosa.

果顯示自製之 CB 多元抗體於上述兩種免疫檢測中，可成功檢測到同源抗原 GSMV，但也會與 TuMV 產生非專一性反應。

討論

本研究乃以核酸分子生物學和血清學免疫法鑑定之結果，首次由宮燈百合上檢出 GSMV，確認罹病組織中有 GSMV 的發生；並首度完成宮燈百合 GSMV-CB 全長度核酸分子定序登錄，完成其多元抗體製備而實用於對 GSMV 的檢測。宮燈百合病毒種類除以往已有紀錄的 CMV 外，由本研究之鑑定結果證明也包括了文獻中所記錄發生於火焰百合上的 GSMV。

血清學為鑑定 *Potyvirus* 屬病毒的分類方法之一 (Moghal & Francki 1976)，惟病毒多元抗體於血清反應中容易有非專一性的結果 (Shepard *et al.* 1974; Shukla *et al.* 1989; Jordan & Hammond 1991)。除了以血清學分類的方式外，近年來兼採用核酸序列比對做分類依據，則可獲得較穩定而正確的鑑定結果 (Ward *et al.* 1992; Adams 2005; Gibbs & Oshima 2010)。

本研究以火焰百合 GSMV (EU042761) (Pham

et al. 2011) 為主所做的 CP 胺基酸相同度分析，其與本研究的 3 個火焰百合分離株以及 GenBank 上已登錄的不同火焰百合來源的 GSMV 分離株相同度介於 86.5–90.6% 之間；但若以本研究的宮燈百合 GSMV-CB 為主，和其他火焰百合分離株相同度均高於 91% (結果未出示)。因此，以宮燈百合分離株做為與火焰百合 GSMV 比對之基礎，或許可有較高的胺基酸相同度可佐以鑑定 GSMV 成員。

本研究同時由不同宮燈百合及火焰百合上獲得不同的 GSMV 分離株，由病毒 CP 核酸序列顯示，此兩種寄主來源之 GSMV 分離株間有高於 91% 以上的相同度，且可於 CP 類緣分析上進一步佐證其他台灣學者已於 GenBank 登錄之火焰百合嵌紋病毒 GLMV (GenBank Acc. no. EU250360)，實屬 GSMV 之成員 (Pham *et al.* 2011)。此外，由本研究的 GSMV CP 類緣分析得知，同屬於宮燈百合來源的 GSMV 親緣關係較相近，然而與火焰百合分離株者為 GSMV 的不同分群，推測 GSMV 可能因不同寄主來源或地理分布而有演化分類上的差異；此種影響類緣關係有差異的原因，也見諸於其他種 potyvirus

病毒 (Ohshima *et al.* 2002; Tomimura *et al.* 2003; Gibbs & Ohshima 2010)。

由胺基酸序列比對 (alignment) 結果顯示，來自宮燈百合的 GSMV 分離株與荷蘭學者發表的火焰百合分離株 (EF042761) (Pham *et al.* 2011)，於第 20、22、42、61 和 91 位址的胺基酸種類相同，但與大部分的火焰百合 GSMV 分離株有差異，推斷此火焰百合分離株 (EF042761) 與宮燈百合分離株者居於相同的分類群，可能與此等位置之胺基酸種類相同有關，但仍需有更多分離株加以分析印證。

本研究以細菌合成系統所製備的 GSMV-CB 多元抗體，於 indirect ELISA 和西方墨點法中，均可與其同源抗原 BEPCB 表現蛋白、宮燈百合和火焰百合罹病組織產生正反應，顯示此多元抗體，可應用在此兩種花卉上對 GSMV 的免疫檢測與鑑定。本研究也發現 GSMV-CB 多元抗體可與同屬於 *Potyvirus* 的 TuMV 反應；然而，於 indirect ELISA 中雖可與 TuMV 產生高於 1.0 之正反應讀值，但於西方墨點法中可依病毒分子量大小而區分出此兩種不同病毒；且另於 RT-PCR 法中，可用本研究所設計的 3 組 GSMV 引子對並不與 TuMV 產生 3 種預估核酸片段 (715、660 或 500 bp) 之條帶而加以區分 (結果未出示)。綜合上述結果顯示，本研究所製備之 GSMV-CB 多元抗體在兩種免疫檢測中，雖不具有對 GSMV 的檢測專一性，但可藉由西方墨點法依病毒 CP 分子量大小，或由 RT-PCR 法依增幅核酸片段的分子量大小，做不同 *potyvirus* 的鑑別性檢測。尤其本研究所設計的 GSMV715u/GSMVd 僅可檢測到宮燈百合 GSMV 分離株，再搭配其他 2 組引子可同時檢出不同寄主來源的 GSMV，可應用此 3 組引子對以 RT-PCR 法就宮燈百合和火焰百合 GSMV 分離株進行快速鑑別檢測。

本研究由兩種寄主來源之 GSMV 分離株，其 CP 核酸序列相互間雖有高於 91% 以上的相同度，仍可藉由 GSMV715u/GSMVd 於 52°C、煉合 40 s 的條件下達到僅檢測到宮燈百合 GSMV 分離株的鑑別效果。推測乃因依據宮燈百合 CB 的 CP 核苷酸序列所設計的上游引子 (GSMV715u) 序列，乃位於 CP 的 N 端對應第 12-29

個核苷酸，其與火焰百合分離株相對應的核苷酸位址處有 22.2% (4/18) 的歧異度所致。*Potyvirus* 屬病毒 CP 的 N 端為歧異度高的區域 (Shukla & Ward 1989)，藉由此區域設計引子而達到區分同種病毒的不同分離株系統，也有見諸於其他的 *potyvirus* 病毒研究 (Langeveld *et al.* 1991; Colinet *et al.* 1994)。

Potyvirus 屬病毒 CP 的 N 端高度歧異的區域，其胺基酸序列可作為種間之鑑別依據，而 CP N 端主要裸露於病毒顆粒表面，為病毒專一性的抗原決定基 (epitopes) 所在 (Shukla *et al.* 1988, 1989)。病毒多元抗體使用於血清免疫法反應中容易有非專一性的結果，乃因裸露於病毒顆粒表面的抗原決定基會因病毒純化或保存時而裂解，導致抗原性的流失 (Shukla *et al.* 1988)。尤其以全長度 CP 為抗原所製備出的多元抗體，更容易導致對特定病毒的非專一性免疫檢測結果 (Shepard *et al.* 1974; Shukla *et al.* 1989)。本研究乃採用細菌表現的 GSMV 全長度 CP 所表現的融合性蛋白，加上經過蛋白質純化後，本質上已不具有完整的病毒 CP 結構體而僅有蛋白質產物，以表現蛋白為抗原所免疫對應產生的多元抗體，對 GSMV 不具有檢測專一性，也因而能檢測到其他病毒如 TuMV。為解決 *Potyvirus* 屬病毒多元抗體常見的非專一性特性，有學者採用利用單株抗體 (Jordan & Hammond 1991) 或是 CP N 端的肽鏈作為抗原而製備出可鑑別“種”的抗體 (Shukla *et al.* 1989; Bhat *et al.* 1999)。

多元抗體藉由「抗原-抗體」的原理，在免疫檢測上有一定的專一性 (Astier *et al.* 2007)，但也會因抗原免疫過程中，因為所對應同一分子的不同抗原決定基 (antigenic determinants) 而產生非專一性反應的結果 (Souiri *et al.* 2014)；而單株抗體來自於對應單一而專一的抗原決定基，則可提供特定專一的鑑別檢測 (van den Heuvel *et al.* 1990; Wu *et al.* 2014)。然而，在診斷鑑定上，仍可藉由單株 (Liu *et al.* 2015) 或多元抗體 (Shukla & Ward 1989) 對不同病毒的非專一性檢測效果，在特定需求上獲得廣效性的病毒檢出。本研究所製備之 GSMV-CB 多元抗體具有對特定 *Potyvirus* 屬病毒 (如 TuMV) 的非專一性檢出效果，可能也具有檢出其他 *Potyvirus* 屬病毒的

潛力，而能增加本多元抗體之廣效性檢測應用，其廣效性檢測的對象，則需有更多來源的 potyvirus 病毒加以佐證。

本研究所製備之 GSMV-CB 多元抗體於西方墨點法中，可檢測出來自宮燈百合和火焰百合罹病組織中之 GSMV，然而呈色結果均可見有其他低分子量之蛋白條帶，推測此可能與系統性感染組織中之病毒 CP 遭到裂解有關 (Larsen *et al.* 1996)，或可能因罹病組織在冷凍保存過程中會有加速蛋白的裂解作用 (Hiebert & McDonald 1973; Bhatnagar *et al.* 2007)。此種 CP 裂解現象在 *Potyvirus* 屬病毒如 TuMV (Hiebert & McDonald 1973)；*Carlavirus* 屬病毒包括 *Kalanchoe latent virus* (Hearon 1984; Dinesen *et al.* 2009)、*Red clover vein mosaic virus* (Larsen *et al.* 1996) 和 *Nerine latent virus* (Chen *et al.* 2016)，以及 *Tobacco rattle virus* (Mayo & Cooper 1973) 均有類似現象。

本研究所製備之宮燈百合 GSMV 抗血清，可實用於 indirect ELISA 和西方墨點法等免疫法檢測，能有效地檢測到此病毒。相關病毒分離株的核酸序列資料和檢測試劑將可做為此等病毒之鑑定比對依據，有助於國內對於進口宮燈百合或火焰百合 GSMV 的發生監測與其生態的瞭解，裨益實務性的檢測應用性以瞭解此病毒在台灣危害之可能風險。

誌謝

本試驗承本組病毒研究室助理莊喻婷小姐協助核酸檢測試驗、台灣大學植物病理與微生物學系高達瑋同學協助核酸檢測分析及選殖試驗。謹此一併致謝。

引用文獻

- 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.
- Astier, S., J. Albouy, Y. Maury, C. Robaglia, and H. Lecoq. 2007. *Principles of Plant Virology: Genome, Pathogenicity, Virus Ecology*. Science Publishers. Enfield, NH. 472 pp.
- Atreya, P. L., C. D. Atreya, and T. P. Pirone. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7887–7891.
- Araki, M., S. Yamashita, Y. Doi, and K. Yora. 1985. Three viruses from gloriosa (*Gloriosa rothschildiana* O'Brien); *Gloriosa fleck virus*, *Gloriosa stripe mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 51:632–636. (in Japanese with English abstract)
- Bhat, A. I., A. Varma, H. R. Pappu, M. Rajamannar, R. K. Jain, and S. Praveen. 1999. Characterization of a potyvirus from eggplant (*Solanum melongena*) as a strain of potato virus Y by N-terminal serology and sequence relationships. *Plant Pathol.* 48:648–654.
- Bhatnagar, B. S., R. H. Bogner, and M. J. Pikal. 2007. Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm. Dev. Technol.* 12:505–523.
- Chang, C. A., E. Hiebert, and D. E. Purcifull. 1988. Purification, 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. 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.* 65:194–206. (in Chinese with English abstract)
- Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2017. Development and application of the molecular and serological detection methods for *Cymbidium ringspot virus*. *J. Taiwan Agric. Res.* 66:202–218. (in Chinese with English Abstract)
- 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.
- 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., J. Kummert, P. Lepoivre, and J. Semal. 1994. Identification of distinct potyviruses in mixedly-infected sweet potato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Phytopathology* 84:65–69.
- Dinesen, M., M. Lundmark, and M. Albrechtsen. 2009. Complete genome sequences of two isolates of *Kalanchoë latent virus*. *Arch. Virol.* 154:1173–1175.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–

- 791.
- Frenkel, M. J., C. W. Ward, and D. D. Shukla. 1989. The use of 3' non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: Application to Watermelon mosaic virus 2 and Soybean mosaic virus-N. *J. Gen. Virol.* 70:2775–2783.
- Gibbs, A. and K. Ohshima. 2010. Potyviruses and the digital revolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:205–223.
- 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.
- Jordan, R. and J. Hammond. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 72:25–36.
- Koenig, R. and D. Lesemann. 1974. A potyvirus from *Gloriosa rothschildiana*. *Phytopath. Z.* 80:136–142.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Langeveld, S. A., J. M. Dore, J. Memelink, A. F. L. M. Derks, C. I. M. van der Vlugt, C. J. Asjes, and J. F. Bol. 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.* 72:1531–1541.
- 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.
- 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. L., W. F. Lin, W. C. Hu, Y. A. Lee, and Y. C. Chang. 2015. A strategy for generating a broad-spectrum monoclonal antibody and soluble single-chain variable fragments against plant potyviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:6839–6849.
- Mayo, M. A. and J. I. Cooper. 1973. Partial degradation of the protein in *Tobacco rattle virus* during storage. *J. Gen. Virol.* 18:281–289.
- Moghal, S. M. and R. I. B. Francki. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. *Virology* 73:350–362.
- Mollov, D., S. Grinstead, M. N. Tahir, M. Reinsel, and J. Hammond. 2017. First report of multiple isolates of *Gloriosa stripe mosaic virus* in *Gloriosa superba* in the United States. *Plant Dis.* 101:1070.
- Ohshima, K., Y. Yamaguchi, R. Hirota, T. Hamamoto, K. Tomimura, Z. Tan, T. Sano, F. Azuhata, J. A. Walsh, J. Fletcher, J. Chen, A. Gera, and A. Gibbs. 2002. Molecular evolution of Turnip mosaic virus: Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen. Virol.* 83:1511–1521.
- 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.
- Pham, K. T. K., M. J. D. de Kock, M. E. C. Lemmers, and A. F. L. M. Derks. 2011. Molecular identification of potyviruses infecting bulbous ornamentals by the analysis of coat protein (CP) sequences. *Acta Hort.* 901:167–172.
- Shiota, A. and S. Uematsu. 1998. *Cucumber mosaic virus* isolated from *Sandersonia aurantiaca* Hook. *Proc. Kanto Tosan Pl. Protect. Soc.* 45:99–100.
- Shukla, D. D., J. Jilka, M. Tomic, and R. E. Ford. 1989. A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity-purified polyclonal antibodies directed towards virus-specific N termini of coat proteins. *J. Gen. Virol.* 70:13–23.
- Shukla, D. D., P. M. Strike, S. L. Tracy, K. H. Gough, and C. W. Ward. 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *J. Gen. Virol.* 69:1497–1508.
- Shukla, D. D. and C. W. Ward. 1989. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Arch. Virol.* 106:171–200.
- Shepard, J. F., G. A. Secor, and D. E. Purcifull. 1974. Immunochemical cross-reactivity between the dissociated capsid proteins of PVY group plant viruses. *Virology* 58:464–475.
- Souiri, A., M. Zemzami, S. Amzazi, and M. M. Ennaji. 2014. Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. *Eur. J. Sci. Res.* 123:281–295.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible 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.
- van den Heuvel, J. F. J. M., C. M. de Blank, R. W. Goldbach, and D. Peters. 1990. A characterization of epitopes on potato leafroll virus coat protein. *Arch. Virol.* 115:185–197.
- Ward, C. W., N. M. McKern, M. J. Frenkel, and D. D. Shukla. 1992. Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. *Arch. Virol. Suppl.* 5:283–297.
- Wu, G. W., M. Tang, G. P. Wang, C. X. Wang, Y. Liu, F. Yang, and N. Hong. 2014. The epitope structure of *Citrus tristeza virus* coat protein mapped by recombinant proteins and monoclonal antibodies. *Virology* 448:238–246.

Molecular and Serological Identification of *Gloriosa stripe mosaic virus* on Christmas Bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook)

Chin-Chih Chen^{1,*}, Fen-Lang Chiang², and Chun-Huey Huang²

Abstract

Chen, C. C., F. L. Chiang, and C. H. Huang. 2018. Molecular and serological identification of *Gloriosa stripe mosaic virus* on Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook). *J. Taiwan Agric. Res.* 67(3):229–246.

A *Potyvirus* virus (isolate code CB) was detected from an imported bulb of Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook), and further identified as the *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) based on the sequences of the coat protein (CP) coding region. The full-length genome sequence of CB was determined, revealing that the CB genome is 9,455 nucleotides (nt) long (accession number EF427894), encoding a polyprotein with 3,052 amino acids (aa). The fragment of 798 nt is coding for 266 aa of the CB CP. Moreover, the CP nt sequences of another five virus isolates, namely CB4 (KT764122) and CB18 (KT764123) from Christmas bells, and GL2 (KT764120), GL3 (KT764124), and GL4 (KT764121) from *gloriosa*, were also determined and shared 86.5–94.0% aa identities with that of the known GSMV-CP (EU042761) in GenBank, indicating that they are also GSMV isolates. The phylogenetic analysis indicated that the CB, CB4, and CB18 from Christmas bells are closely related. Three primers sets (upstream primers: GSMV7150u, GSMV660u and GSMV500u, and a common downstream primer: GSMVd) were designed from the CB-CP sequence for detection of GSMV. The primer pairs GSMV660u/GSMVd and GSMV500u/GSMVd were useful to amplify the expected amplicons from all of GSMV isolates from Christmas bells and *gloriosa* in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The primer pair GSMV715u/GSMVd can amplify the expected 715-bp fragment only from the GSMV isolates of Christmas bells, and is useful for distinguishing those GSMV isolates of Christmas bells from *gloriosa*'s. The full-length nucleotides of the CB-CP were constructed to the expression vector pET28b, and transformed into *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) for induction of the overexpressed viral protein. Polyclonal antiserum against the CB-CP, prepared by immunizing the bacterial expressed fusion protein into a rabbit, positively reacted with the GSMV-CP in the virus-infected Christmas bells and *gloriosa* tissues in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blotting. In this report, GSMV was first found on Christmas bells, and its full-length genome sequence was first completed. The prepared GSMV primer pairs and polyclonal antiserum are helpful to strengthen our ability in GSMV inspection.

Key words: Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook), *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV), Full-length sequence, RT-PCR detection, Polyclonal antibody.

Received: October 10, 2017; Accepted: November 28, 2017.

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

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

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