

豇豆微斑駁病毒之鑑定與生物特性分析

鄭櫻慧^{1*} 陳金枝¹ 簡蘭懿² 張清安³

摘要

鄭櫻慧、陳金枝、簡蘭懿、張清安。2021。豇豆微斑駁病毒之鑑定與生物特性分析。台灣農業研究 70(1):67-79。

採集自嘉義縣新港鄉的長豇豆及南投縣草屯鎮的敏豆疑似感染病毒樣本，經過分離得到 *Calavirus* 屬的豇豆微斑駁病毒 (cowpea mild mottle virus; CpMMV) 的長豇豆分離株 (CpMMV-V) 及敏豆分離株 (CpMMV-P)，以機械接種回接長豇豆及敏豆均可以感染並引起與田間相似葉片斑駁的病徵。2 分離株接種其他豆科作物時，以植株全株來看無明顯矮化或發育不良，但從葉片可觀察到斑駁與黃化斑點等輕微病徵。採自病株種子以出芽測試未測得 CpMMV 藉由種子傳播的現象，電子顯微鏡則可觀察到長桿狀病毒顆粒。抽取植物之總量 RNA，以 potyvirus 簡併式引子 (HRP5/dT) 進行反轉錄聚合酶連鎖反應，意外擴增出約 1 Kb 的 DNA 產物，定序分析並與登錄於 GenBank 上的序列比對，此段 DNA 含括豇豆微斑駁病毒的部分鞘蛋白基因至基因體 3' 端。再次以專一性引子擴增、選殖及定序分析完整鞘蛋白基因，長豇豆分離株之鞘蛋白基因 (JX070669) 與敏豆分離株 (JX020701) 之鞘蛋白基因具有 88.9% 核苷酸相同度與 97.6% 胺基酸相同度，與網站上其他 CpMMV 鞘蛋白基因比較，核苷酸相同度介於 98.7-75.7%，胺基酸相同度介於 97.9-91.3% 之間。部分純化病毒懸浮液再以 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 純化病毒的鞘蛋白，經免疫白兔製備抗血清，其抗體可應用於西方漬染法及酵素結合免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 檢測。因此，乃進行田間偵測調查，發現 CpMMV 常見危害台灣中部地區栽培之敏豆。由於粉蝨為台灣常見害蟲，其媒介傳播之 CpMMV 除了危害長豇豆及敏豆以外，是否危害其他豆科作物尚待更多調查。

關鍵詞：豇豆微斑駁病毒、鞘蛋白、抗血清。

前言

長豇豆又名菜豆、豆角、籩豆，學名為 *Vigna unguiculata* subsp. *Sequipedalis*，英名為 asparagus bean、yard-long bean，原產於印度，具耐熱、耐濕特性，營養價值高。敏豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 又稱菜豆、雲豆、四季豆等，原產於中美洲，南北美洲一帶自古即有栽培，現由中美洲到日本北海道皆有種植 (Kuo 1995)。根據行政院農業委員會統計年報 (<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>)，2018 年長豇豆種植面積超過 920 ha，產值

430,359 千元，以屏東縣、高雄市及雲林縣為主要產區。敏豆種植面積超過 1,414 ha，產值 1,086,016 千元，以南投縣、屏東縣及高雄市為主要產區。台灣長豇豆的主要病害有病毒病、白粉病及煤黴病，次要病害有立枯病、萎凋病、白絹病、銹病、濕腐病、炭疽病及根瘤線蟲。敏豆主要病害有疫病、角斑病、白絹病、銹病及炭疽病等 (Tzeng 2019)。危害長豇豆的病毒有 3 種，豆類普通嵌紋病毒 (bean common mosaic virus; BCMV)、胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic virus; CMV) 及豇豆蚜媒嵌紋病毒 (cowpea aphid-borne mosaic virus;

投稿日期：2020 年 11 月 24 日；接受日期：2020 年 12 月 23 日。

* 通訊作者：yhcheng@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。

³ 朝陽科技大學生化科技研究所教授。台灣 台中市。

CAMV)，其中以 BCMV、CMV 較為常見。敏豆則只有 CMV 危害紀錄。BCMV、CMV 可藉由種子、人為摘心造成的機械傷口及蚜蟲媒介傳播。長豇豆單獨感染 BCMV 時，病徵輕微，但複合感染 BCMV 及 CMV 時，呈現葉片皺縮、嵌紋、植株矮化及豆莢變形等病徵，影響產量甚鉅 (Chang 1983)，種植「無病毒健康種子繁殖體系」所生產的種子可大幅降低病毒病害發生 (Chang *et al.* 1994)。

豇豆微斑駁病毒 (cowpea mild mottle virus; CpMMV) 首次在印度東部加納的豇豆被發現 (Brunt & Kenten 1973)，之後廣泛分布於東部地區的加納與非洲西部，此病毒可自然感染其他豆科作物，如花生 (*Arachis hypogaea* L.)、大豆 (*Glycine max* L.)、綠豆 (*Vigna mungo* L.)、敏豆 (*Phaseolus vulgaris* L.)、長豇豆 (*Vigna unguiculata* subsp. *Sequipedalis*) 和蠶豆 (*Vicia faba* L.)，以及其他科別作物如：番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、菸草 (*Nicotiana clevelandii* Gray) 與木瓜 (*Carica papaya* L.) (Brunt & Philips 1981; Thouvenel *et al.* 1982; Anno-Nyako 1986; Mink & Keswani 1987; Demski & Kuhn 1989; Reddy 1991; Rodriguez Pardiña *et al.* 2004; Brito *et al.* 2012; Mumo *et al.* 2020) 等。東南亞地區的大豆與花生上也曾發現感染 CpMMV (Iwaki *et al.* 1982; Iizuka *et al.* 1984; Antignus & Cohen 1987; Mali & Nirmal 1987; Shahraeen 1989; Reddy 1991; Yadav *et al.* 2013)。CpMMV 屬於 *Flexiviridae* 科，*Carlavirus* 屬。媒介昆蟲為煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci* G.)，以非永續性方式傳播 (Iwaki *et al.* 1982; Muniyappa & Reddy 1983; Jeyanandarajah & Brunt 1993; Rosario *et al.* 2014; Zanardo & Carvalho 2017)。

台灣的長豇豆及敏豆也有發現 CpMMV 的報告 (Chang *et al.* 2013)，本研究將釐清 CpMMV 台灣分離株之寄主範圍，種傳特性，分析比對鞘蛋白序列，製備抗血清，並初步調查 CpMMV 在台灣發生情形。

材料與方法

病毒之分離與寄主範圍測定

2009 年從嘉義縣新港鄉採集到疑似病毒感染的長豇豆及南投縣草屯鎮採集的敏豆，酵素結合免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 檢測長豇豆樣本與 BCMV strain blackeye cowpea mosaic (BCMV-BICM) 之抗血清反應，敏豆樣本則否。長豇豆樣本機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*)，產生不同的 2 種黃斑，7 d 左右出現的黃斑為 BCMV-BICM 感染引起；另外，有 10 d 左右出現的模糊黃斑，將之接種於紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 產生清晰可見的黃斑。之後利用紅藜進行病毒分離，經過 3 次單斑分離得到病毒的長豇豆分離株 (CpMMV-V)。敏豆樣本機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 產生細小黃斑，以奎藜進行 3 次單斑分離得到病毒的敏豆分離株 (CpMMV-P)。將分離所得的 2 個病毒分離株保存於紅藜及奎藜，取黃色病斑之葉片置於 50% 甘油於 -20°C 保存，作為後續研究之病毒來源。另外，接種於圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*)，作為寄主範圍測定之接種原。

測試寄主範圍時，感染 CpMMV 之 2 分離株之奎藜病葉以 0.05 M PBS 研磨成汁液，以機械接種分別於長豇豆 (*Vigna unguiculata* subsp. *Sequipedalis*)、敏豆 (*Phaseolus vulgaris* L.)、綠豆 (*Vigna radiata* L. R. Wilczek)、紅豆 [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi]、皇帝豆 (*Phaseolus lunatus* L.)、蠶豆 (*Vicia faba* L.)、豌豆 (*Pisum sativum* L.)、黃豆 (*Glycine max* L. Merrill)、花豆 (*Phaseolus coccineus* L. var. *albonanus* Bailey) 與花生 (*Arachis hypogaea* L.) 共 10 種食用豆科作物進行測試，置於網室進行病徵觀察。接種植物則連續觀察 4 wk 並每週採取葉片，進行間接式酵素結合免疫吸附分析法 (indirect ELISA) (Clark & Adams 1977) 確認病毒之感染與否及病徵表現情形。接種試驗重複進行 3 次，發病率為 3 次的平均值。

種子帶毒之出芽測試

接種 CpMMV-V 的綠豆與長豇豆及 CpMMV-P 的紅豆與敏豆種植於網室內，待其開花結果，豆莢變褐色變乾後，收取其種子陰乾。逢機取出 4 種豆類種子各 100 顆，播種於網室內進行出芽試驗。發芽後之子葉與真葉分別進行兩次 ELISA 檢測，測試有無病毒感染。

電子顯微鏡觀察

使用陰染法 (negative stain) (Hall 1964)，將感染病毒之長豇豆或敏豆葉片各切一小片分別放在載玻片上，加一滴 2% 磷鎢酸 [phosphotungstic acid (PTA), pH 7.0]，以刀片切碎，再以毛細管吸取，滴於銅網 (300 mesh) 上，待乾燥後以電子顯微鏡觀察病毒粒子之形態。

病毒鞘蛋白之純化與抗血清製備

以 CpMMV-V 接種約 15 d 出現黃斑的奎藜葉片作為病毒純化材料，依 Gonsalves & Ishii (1980) 的方法略加修改進行純化。每克病葉加入 2 mL 0.5 M 磷酸萃取緩衝液 (phosphate extraction buffer，以下簡稱 PE 緩衝液) (pH 7.5) 以果汁機打碎，過濾後加入氯仿及酚 (各 0.5 mL g⁻¹) 淨化，經低速離心去除綠色殘渣。上清液加入 8% PEG6000，於 4°C 下攪拌 30 min 後，經低速離心取其沉澱物，以 0.1 M PE 緩衝液 (pH 7.0) 懸浮，再經低速離心去除綠色殘渣。上清液加入 8% PEG 及 0.3 M NaCl，攪拌後經低速離心，沉澱物以 0.1 M PE 緩衝液懸浮。懸浮液以 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 分析，切下白色蛋白帶，以 PE 緩衝液析出，定量至 1 mg mL⁻¹，委外免疫白兔製備 50 mL 的抗血清。再以所得抗血清純化免疫球蛋白 G (immunoglobulin G; IgG)，濃度調整為 1 mg mL⁻¹，作為 ELISA (Clark & Adams 1977) 或 Western blotting (Gooderham 1984) 之用。

SDS 免疫擴散反應 (SDS-immunodiffusion test)

依 Purcifull & Batchelor (1977) 及 Chang

et al. (1990) 的方法進行，配置含有 0.5% SDS 及 1% NaN₃ 之 0.8% agar，取 12 mL 倒入直徑 9 cm 之培養皿，凝固後以打孔器打孔，每孔直徑為 5 mm，每孔距離為 35 mm。之後依序將前述純化鞘蛋白委外免疫白兔製備之抗血清、CpMMV-V 與 CpMMV-P 之病葉汁液與未接種之植株汁液分別置於孔中，進行抗原與抗體反應 16 h，觀察抗血清與抗原反應。

ELISA

試驗參照 Clark & Adams (1977) 報告進行間接式酵素結合免疫吸附分析，取 0.1 g 之罹病葉組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，取 200 μL 加入 EIA 反應盤內，每樣品 2 個重複，置於 4°C 冰箱 16 h 進行覆膜反應 (coating reaction)。然後以 1× PBST 緩衝液 (137.0 mM NaCl + 1.5 mM KH₂PO₄ + 1.0 mM Na₂HPO₄ + 0.05% Tween 20, pH 7.4) 沖洗 3 次。其後加入 150 μL 不同濃度由自製抗血清純化的 IgG 後，放置在 37°C 定溫箱反應 2 h。再以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次後，每孔加入 120 μL 已溶於磷酸緩衝液 (137.0 mM NaCl + 1.5 mM KH₂PO₄ + 1.0 mM Na₂HPO₄ + 0.05% Tween 20, pH 7.4) 之山羊抗兔二次抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, USA)，置於 37°C 之定溫箱中反應 2 h。最後，再以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次後，再以 120 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, OH, USA) 進行呈色反應。反應後 20–30 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，作為評估病毒濃度高低之依據。樣品的讀值大於健康葉片之 2 倍者，視為正反應。

西方漬染法 (Western blotting)

取 0.1 g 供試之病葉組織，以液態氮磨碎後，加入 200 μL 之樣品處理液 (75 mM Tris-HCl

+ 10 mM KCl + 10 mM MgCl₂ + 1 mM EDTA + 30% glycerol + 6% SDS + 9% β-Mercaptoethanol + 0.015% Bromophenol blue)，研磨液加熱處理後經 SDS-PAGE 電泳，膠體上之蛋白轉漬於 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)，再以前述自製抗血清進行漬染反應 (Gooderham 1984)。

RNA 之抽取及反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)

取 100 mg 的病葉，利用總量 RNA 純化試劑組 (Total RNA extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany) 進行 RNA 之萃取，得到總量 RNA。病毒 RNA (viral RNA) 之抽取則取純化病毒以病毒 RNA 純化試劑組 (Viral RNA extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany) 進行萃取。以純化所得之 RNA 進行 RT-PCR，RT-PCR 以單一步驟 RT-PCR 試劑組 (Genemark Co., Taichung, Taiwan) 進行，25 μL 的反應液中加入 1 μL 的 RNA，各 2.5 μL 之 20 μM 簡併式引子 Hrp5/Pot1 (Pappu *et al.* 1998) 或比對 GenBank 登錄之 CpMMV 基因序列，設計位於鞘蛋白基因上游之專一性引子 (5'TATTTGACTGG-GGAGTCTTTCA3')/Pot1，RT-PCR 之進行於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA) 中，設定反應程序為 50°C 下進行反轉錄 30.0 min，94°C 變性 1.5 min 後，進行 30 個 PCR 循環反應。在 94°C 下變性 1.0 min，50°C 下鍊合 1.5 min，72°C 下聚合 2.0 min，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6.0 min。反應產物以 1.2% Agarose (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA) 電泳，分析增幅產物之分子量。

基因選殖及定序分析

RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段，以小量膠體 DNA 回收組 (Genemark Co., Taichung City, Taiwan) 回收 DNA，以 pGEM-T Cloning Kit (Promega Co., Madison, WI, USA) 進行選殖。篩選得到之選殖株抽取質體經限制酶 EcoRI 酶切確認選殖 DNA 大小後，用於進行定序分析。

定序反應委託明欣生物科技公司進行，所得之核苷酸序列以 Vector NTI Suite (InfoMax Inc., Madison, WI, USA) 分析軟體與 GenBank 上已登錄之核苷酸序列進行分析比對，再以 MEGA (Molecular Evolution Genetic Analysis) version 7.0 (Kumar *et al.* 2018) 繪製親緣關係樹狀圖。

結果

病毒分離與寄主範圍測定

分離病毒時以罹病葉片汁液進行接種，在紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 葉面出現黃色圓斑，奎藜 (*C. quinoa*) 葉面則出現模糊黃斑，因此以紅藜進行 3 次單斑分離病毒株。之後接種於圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*)，作為以下寄主範圍測定之接種原。單斑分離病毒株 CpMMV-V 及 CpMMV-P 回接長豇豆與敏豆，產生葉片斑駁病徵 (圖 1)。

CpMMV-V 及 CpMMV-P 都以圓葉菸草病葉為接種原，分別接種 10 種豆科作物，連續觀察病徵反應 4 wk 並配合間接式酵素結合免疫吸附反應測試病毒的感染之情形，CpMMV-V 及 CpMMV-P 寄主範圍測定結果如表 1。

比較分別接種 CpMMV-V 與 CpMMV-P 之供試植株，以植株全株來看無明顯矮化或發育不良等差異，但若從葉片個別比較可看到一些斑駁、黃化斑點與葉片略黃化等病徵產生。其中，在花豆、敏豆與黃豆葉片上以肉眼可觀察到黃化斑點與著綠不均，毛豆則是葉片上略帶斑駁，但大多數如在皇帝豆、蠶豆、紅豆與綠豆等葉片無明顯病徵。

將所有接种植株之葉片，透過 ELISA 檢測，觀察植株病徵情形。從結果顯示，發現 CpMMV-V 與 CpMMV-P 在花豆、敏豆、黃豆成功接種之感染率皆有 70% 以上，然而綠豆感染率為 58.1% 與 50.8% (表 1)。

接種 CpMMV-P 於紅豆、黃豆、皇帝豆、蠶豆、花生及豌豆，其成功接種比率皆優於 CpMMV-V；綠豆、長豇豆、敏豆及花豆則以 CpMMV-V 之接種率較高。由此數據，可知在 10 種供試植物中，以兩株分離株而言，敏豆之感受性最高也最佳，其次是花豆，最後

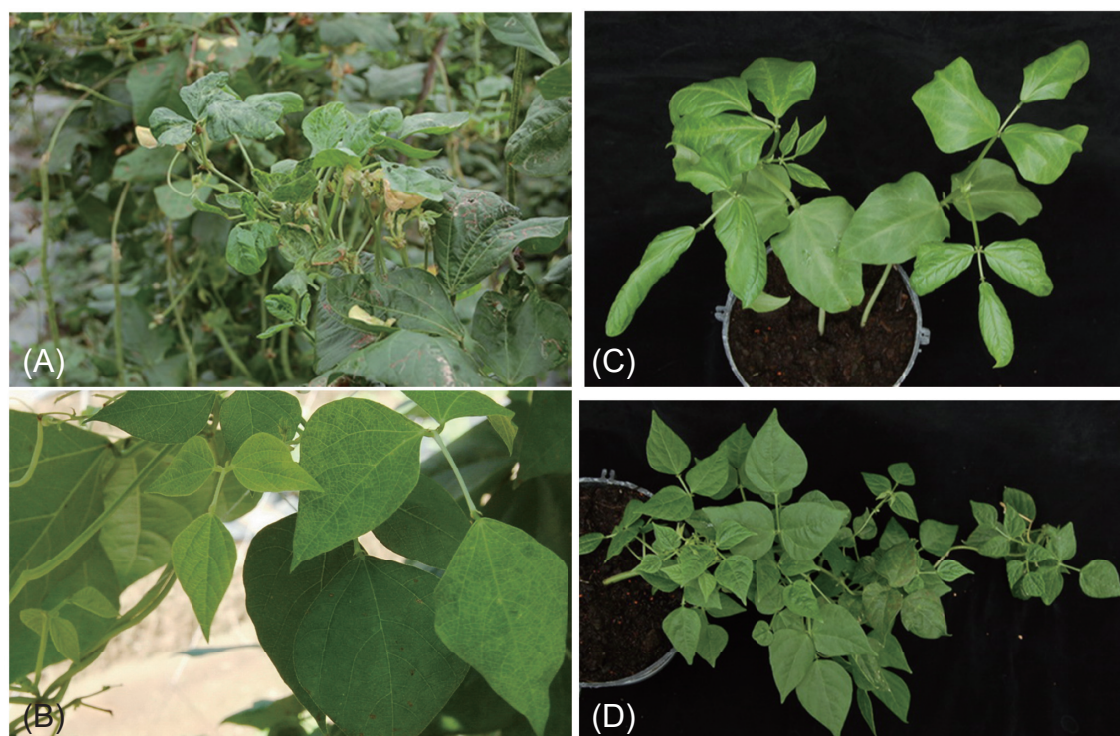


圖 1. 豇豆微斑駁病毒 (A) 長豇豆與 (B) 敏豆分離株於田間原始病徵及經過單離後回接原寄主 (C) 長豇豆與 (D) 敏豆之葉片斑駁等病徵。

Fig. 1. Severe symptoms caused by cowpea mild mottle virus (CpMMV) infecting (A) asparagus bean and (B) French bean were observed in the field. By mechanical inoculation, leaf mottle on (C) asparagus bean and (D) French bean were developed.

表 1. 豇豆微斑駁病毒兩分離株之豆科寄主作物接種測試。

Table 1. Reactions of the experimental Fabaceae crops by mechanically inoculated with two isolates V and P of cowpea mild mottle virus (CpMMV).

Tested plant	Chinese name	CpMMV-V		CpMMV-P	
		Sym ^z	DI ^y	Sym	DI
<i>Vigna angularis</i> (Willd.) Ohwi & H. Ohashi	紅豆	N	11.3	N	72.2
<i>Vigna radiate</i> L. R. Wilczek	綠豆	N	58.1	N	50.8
<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sequiopedalis</i>	長豇豆	N	67.1	N	19.4
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	敏豆	CB	100.0	CB	93.3
<i>Glycine max</i> L. Merrill	黃豆	CB	72.7	CB	90.5
<i>Phaseolus lunatus</i> L.	皇帝豆	N	41.1	N	65.3
<i>Vicia faba</i> L.	蠶豆	N	0	N	38.1
<i>Phaseolus coccineus</i> L. var. <i>albonanus</i> Bailey	花豆	CB	100.0	CB	77.8
<i>Arachis hypogea</i> L.	花生	N	13.3	N	37.5
<i>Pisum sativum</i> L. subsp. <i>sativum</i>	豌豆	N	40.3	N	95.2

^z Abbreviations used; N: no symptoms; CB: chlorotic blotches.

^y Disease incidence (%): (number of infected plants/totality tested plants) × 100%. Each treatment contained 3 replications.

是黃豆。而單獨以 CpMMV-V 來看，感受性最高是以敏豆及花豆，其次是黃豆及長豇豆；而 CpMMV-P 則是以敏豆及豌豆最佳，其次黃豆，再其次是花豆及紅豆 (表 1)。

種子帶毒之出芽測試

以經過 RT-PCR 檢測後，確定為罹染 CpMMV-V 之綠豆與長豇豆或 CpMMV-P 之紅豆與敏豆植株作為留種之用。各取 100 顆採自病株種子進行出芽測試，置於網室至發芽後，採集發芽之子葉與真葉進行 2 次 ELISA 檢測，測試種子是否帶毒。

從子葉與真葉 2 次 ELISA 檢測結果中，4 種豆類皆無帶毒率。綠豆及敏豆在第一次子葉檢測中，各有 7 棵及 2 棵植株測得的數值介於 2 倍健康之猶豫值間，但在第 2 次真葉檢測時就無此情形產生 (表 2)。由出芽測試結果未測到 CpMMV-V，會透過綠豆與長豇豆或 CpMMV-P 會透過紅豆與敏豆之種子傳毒之情形。

電子顯微鏡觀察病毒型態

將感染病之毒長豇豆或敏豆葉片使用陰染法處理，以電子顯微鏡觀察 CpMMV-V 與 CpMMV-P 兩分離株的病毒顆粒形態 (圖 2)，可看到皆為長桿狀，長度約為 600 nm，此兩株分離株病毒顆粒型態符合 *Carlavirus* 病毒屬之特性。

表 2. 罹病植株採集之種子發芽率與種子帶毒率。

Table 2. The germination and transmission rates of seeds collected from CpMMV-infected plants.

Virus/plant ^z	Germination rate (%) ^y	Seed-transmissibility	
		1 ^x	2 ^w
CpMMV-P/Adzuki bean	74	0/74	0/74
CpMMV-P/French bean	72	7/72	0/72
CpMMV-V/Mung bean	69	2/69	0/69
CpMMV-V/Cowpea	62	0/62	0/62

^z Seed-transmissibility: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of 100 seeds collected from infected plants.

^y (Number of germination seeds/total number of seeds) × 100%.

^x Detection of cotyledon: (number of infected seeds/total number of seeds) × 100%.

^w Detection of compound leaf: (number of infected seeds/total number of seeds) × 100%.

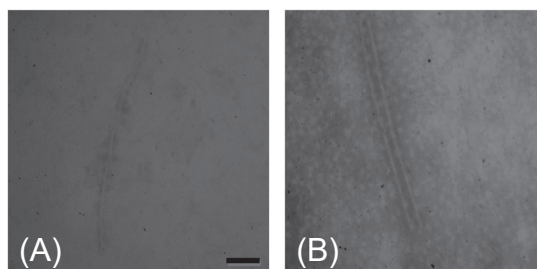


圖 2. 電子顯微鏡觀察豇豆微斑駁病毒 (cowpea mild mottle virus; CpMMV) 兩分離株之病毒顆粒。(A) CpMMV-V 分離株；(B) CpMMV-P 分離株。

Fig. 2. Electron micrographs of flexuous filaments viral particles of cowpea mild mottle virus (CpMMV) prepared by leaf-dip method. Bar represents 200 nm. (A) CpMMV-V isolate; and (B) CpMMV isolate P.

抗血清與抗體之應用

SDS 免疫擴散反應

透過 SDS 免疫擴散觀察 CpMMV-V 之抗血清與兩株分離株經 16 h 的免疫反應，結果可以看到 CpMMV-V、CpMMV-P 奎藜病汁液與抗血清間呈現同源正反應。二者與抗血清皆有沉澱帶產生，且沉澱帶互相融合，可以發現 CpMMV-M 與 CpMMV-G 間之親緣關係 (圖 3)。

間接式酵素結合免疫吸附反應測試最佳 IgG 使用濃度

將罹病奎藜葉片以 coating buffer 研磨，依序加入微量盤中完成披覆後，加入不同濃度 IgG ($1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、 $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、 $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、 $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$) 反應，再加入 2 級抗體，完成呈色反應 (圖 4)。加入之 IgG 濃度高於 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 時，偵測 CpMMV-V 及 CpMMV-P 2 分離株吸收值都高於 1.0。未接種奎藜對照之吸收值低於 0.2，明顯可區分有無罹染 CpMMV。抗血清以純化 CpMMV-V 之鞘蛋白為抗原免疫白兔，因此在 ELISA 反應中，IgG 與 CpMMV-V 的反應讀值較 CpMMV-P 高。

西方漬染法

以西方漬染法進行分析採集自不同地點長豇豆樣本，其鞘蛋白分子量介於蛋白標誌 27–41 kDa 之間，推估其分子量約為 32 kDa

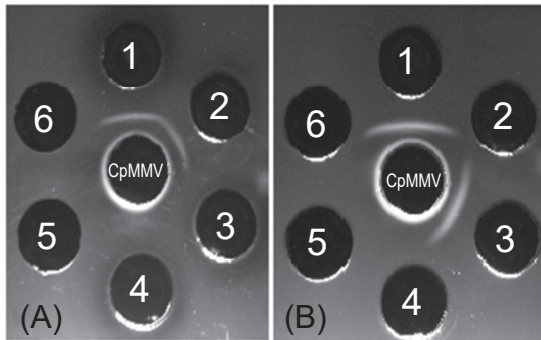


圖 3. SDS 免疫擴散法反應分析抗血清之免疫反應特性。中央穴：抗血清；周圍穴：分別添加經 SDS 處理之葉片汁液。(A) 1：CpMMV-V 奎藜病汁液；2：CpMMV-P 奎藜病汁液；3、4：未接種病毒之奎藜葉片汁液；5、6：無菌水。(B) 1：CpMMV-V 奎藜病汁液；3：CpMMV-P 奎藜病汁液；2、4：未接種病毒之奎藜葉片汁液；5、6：無菌水。

Fig. 3. Reaction of polyclonal antisera against cowpea mild mottle virus (CpMMV) in SDS-immunodiffusion test. Central well: polyclonal antisera of CpMMV; peripheral wells: SDS-treated antigens. (A) 1: CpMMV-V infected *Chenopodium quinoa*; 2: CpMMV-P infected *C. quinoa*; 3 and 4: healthy tissues of *C. quinoa*; 5 and 6: sterile water. (B) 1: CpMMV-V infected *C. quinoa*; 3: CpMMV-P infected *C. quinoa*; 2 and 4: healthy tissues of *C. quinoa*; 5 and 6: sterile water.

(圖 5)，符合 CPMMV 之鞘蛋白分子量 (Naidu *et al.* 1998)。

CPMMV 二分離株鞘蛋白基因核苷酸之序列分析比對

罹病樣本抽取總量 RNA，利用偵測 Potyvirus 之簡併式引子 Hrp5 和 Pot1 (Pappu *et al.* 1998) 的進行 RT-PCR，反應結果以 1.2% Agarose 電泳分析，意外觀察到增幅出 1.0 kb 之 DNA 產物 (圖 6)。增幅之 DNA 片段選殖至 pGEM-T 選殖套組，所得之選殖株經定序後，共有 965 個核苷酸，包含病毒之部分鞘蛋白基因、P6 基因和 3' 非轉譯區。根據 CpMMV 之核苷酸序列於鞘蛋白基因設計專一性引子，配合上述 Pot1 引子進行 RT-PCR，DNA 產物加以選殖定序分析，得到全長度鞘蛋白基因，共含有 867 核苷酸轉譯成 289 胺基酸。其中，CpMMV-V 部分在 GenBank 登記為 Acc. No. JX070669，與巴西分離株 (DQ444266) 核苷酸相同度最高，達 98.7%；CpMMV-P (Acc. No. JX020701) 與中國分離株 (MN908944) 核苷酸相同度最高，達 94.7%，與其他 CpMMV 鞘蛋

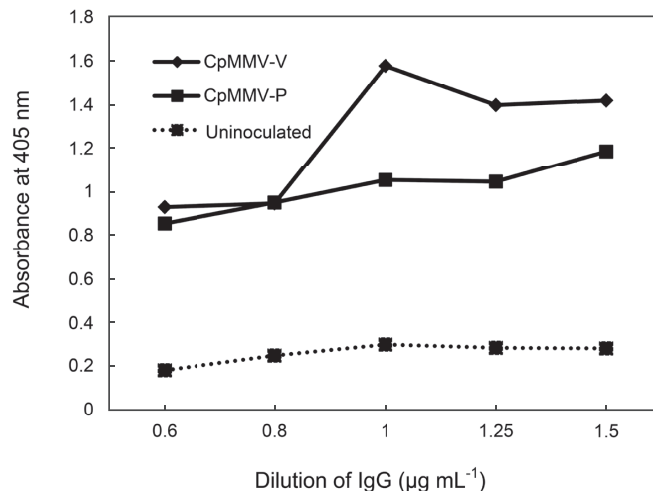


圖 4. 間接式酵素連結免疫吸附法檢測豇豆微斑駁病毒與不同 IgG 濃度 (1.50、1.25、1.00、0.80 及 0.60 µg mL⁻¹) 吸收值之影響。◆：接種 CpMMV-V 奎藜葉片；■：接種 CpMMV-P 奎藜葉片；●：未接種之奎藜葉片。

Fig. 4. Effect of concentration of immunoglobulin G (IgG) (1.50, 1.25, 1.00, 0.80, and 0.60 µg mL⁻¹) against cowpea mild mottle virus in enzyme-linked immunosorbent assay. The dilution ratio of plant sap and secondary antibody used in the assay were 1:30 (w/v) and 1:5,000 (w/v), respectively. ◆: CpMMV-V infected *Chenopodium quinoa*; ■: CpMMV-P infected *C. quinoa*; ●: Uninoculated *C. quinoa*.

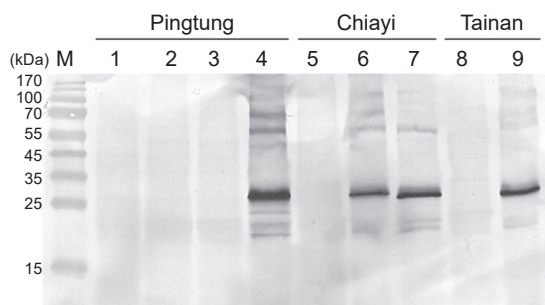


圖 5. 以西方漬染法偵測採集自屏東縣、台南縣及嘉義縣的長豇豆樣本是否感染豇豆微斑駁病毒。

Fig. 5. Detection of cowpea mild mottle virus (CpMMV) on infected asparagus bean plants by Western blotting. Antiserum against CpMMV coat protein was used to react with the crude saps extracted from the asparagus bean samples collected from Pingtung, Tainan and Chiayi Counties.

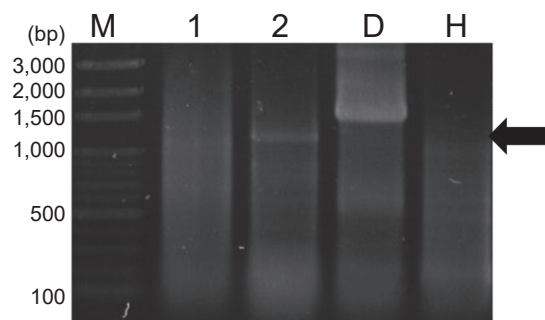


圖 6. 利用 potyviruses 的簡併式引子 (Hrp5/Pot1) 進行 RT-PCR 偵測豇豆樣本的增幅產物分析：豆類普通嵌紋病毒為正對照，增幅 1.3 kb DNA 產物 (D)；豇豆微斑駁病毒增幅 1.0 kb DNA 產物 (1, 2)；未感染的豇豆樣本為健康對照 (H)。

Fig. 6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with degenerate primers of potyviruses (Hrp5/Pot1) to detect cowpea mild mottle virus (CpMMV). Products of 1.3 kb DNA amplified from total DNA of bean common mosaic virus (BCMV) infected asparagus bean plant shown in lane D and 1.0 kb DNA amplified from cowpea mild mottle virus (CMMV) infected asparagus bean samples shown in lanes 1 and 2. Non-infected asparagus bean samples as healthy control shown in lane H.

白基因，核苷酸序列相同度介於 98.7–75.7%，胺基酸序列相同度介於 97.9–91.3% 之間。台灣 2 分離株之核苷酸相同度為 88.9%，胺基酸相同度為 97.6%，2 分離株僅有 6 個胺基酸不同，胺基酸相同度較核苷酸相同度大幅提高，

國外分離株亦有此特性。將所有 CPMMV 分離株鞘蛋白序列繪製親源樹，觀察彼此之間的親源關係，其結果本試驗所獲得兩分離株分在不同一支群 (圖 7)。

討論

CpMMV 屬於 *Carlavirus* 屬，病毒顆粒呈長絲狀，長度約 620–700 nm，直徑為 12–15 nm。Menzel *et al.* (2010) 於加納長豇豆上分離出 CpMMV，其病毒型態，長度介於 620–660 nm 間，而本試驗之兩分離株透過電子顯微鏡下觀察，其形態與顆粒大小，皆與 *Carlavirus* 之 CpMMV 病毒型態相符合 (圖 2)。根據 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 針對 *Carlavirus* 屬內種的區分標準為，當 CP 或 replicase genes 核苷酸相同度小於 72%，或者是胺基酸相同度小於 80% 時，即為不同種病毒。從兩分離株之鞘蛋白進行比對，其核苷酸與胺基酸相同度達 88.8% 與 97.9%，此結果得到兩分離株確實為同種病毒不同作物之分離株。試驗中製備了多元抗血清，此抗血清不僅應用於 SDS 免疫擴散反應觀察病毒株之間鞘蛋白相關程度，用於西方漬染法觀察到病毒鞘蛋白分子量等病毒學上的證據，更可應用於間接式酵素結合免疫吸附反應。以目前 CpMMV 的 2 分離株鞘蛋白胺基酸相同度高達 97.6%，此抗血清應可順利檢出不同分離株之 CpMMV，適合用於進行田間調查，瞭解此病毒在台灣確實分布情形。

長豇豆與敏豆是台灣重要的豆科蔬菜之一，以往台灣感染豆科植株之病毒，主要以 CMV、BCMV、CAMV 等，其中又以 BCMV 與 CMV 複合感染所產生的危害最為嚴重 (Chang 1983)，且此 2 種病毒可以透過種子傳播，造成更廣泛的危害。我國之長豇豆健康種子繁殖制度已行之有年，大幅阻絕病毒危害 (Chang *et al.* 1994)。以往危害敏豆的病毒只有零星發生的 CMV，敏豆的病毒病害並不常見。近年的調查僅確知長豇豆與敏豆受到 CpMMV 危害 (Chang *et al.* 2013)，接種測試寄主範圍的試驗中，CpMMV 也感染花生、紅豆、皇帝豆、黃豆與豌豆等台灣常見作物，但

由種子傳播 (King *et al.* 2011)，直到 Barreto da Silva *et al.* (2020) 證明巴西的分離株感染特定品種大豆，病毒可經由種子傳播。種子傳播可大幅增加病毒遠距離傳播的能力。試驗中亦收集接種 CpMMV-V 之綠豆與長豇豆和帶有 CpMMV-P 之紅豆與敏豆的種子，各播種 200 顆種子測試發芽苗是否帶毒，試驗中並未測出病株。台灣分離株初步未觀察到可經由種子傳播，但 4 種作物均只各測試 1 個品種，台灣分離株是否種傳仍需要更廣泛測試。

台灣 2 分離株在寄主測試中可感染多數測試豆類，但除了敏豆之外，多數病徵輕微，容易被忽略。一旦在某豆科植株上帶有此病毒，就很容易藉由媒介昆蟲粉蝨在短時間內快速的散播開來，而造成大規模的蔓延，如中部地區在敏豆上造成之危害。本研究已建立的抗血清檢測方法如 ELISA，提供調查利器，藉由更多田間調查可以瞭解 CpMMV 在台灣不同豆科作物發生情形，作為建立防治策略之基礎。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 102 農科-10.1.2-農-C1(1)、103 農科-10.2.2-農-C2(4)、104 農科-10.7.2-農-C1(4) 計畫經費支持，更依賴多位研究同仁蔡佳芬、王昭萍、江芬蘭和蔡筱婷，以及當時研究生江佳典等共同協助完成，謹此致謝。

引用文獻

- Anno-Nyako, F. O. 1986. Semipersistent transmission of an 'extra mild' isolate of cowpea mild mottle virus on soya bean by the whitefly *Bemisia tabaci* Genn. in Nigeria. *Trop. Agric.* 63:193-194.
- Antignus, Y. and S. Cohen. 1987. Purification and some properties of a new strain of cowpea mild mottle virus in Israel. *Ann. Appl. Biol.* 110:563-569. doi:10.1111/j.1744-7348.1987.tb04174.x
- Barreto da Silva, F., C. Muller, V. H. Bello, L. F. M. Watanabe, B. Rossitto De Marchi, L. M. Fusco, M. R. Ribeiro-Junior, G. B. Minozzi, L. M. Vivan, M. A. Tamai, J. R. Farias, A. M. Nogueira, M. M. P. Sartori, and R. Krause-Sakate. 2020. Effects of cowpea mild mottle virus on soybean cultivars in Brazil. *Peer J.* 8:e9828. doi:10.7717/peerj.9828
- Brito, M., T. Fernández-Rodríguez, M. J. Garrido, A. Mejías, M. Romano, and E. Marys. 2012. First report of cowpea mild mottle carlavirus on yardlong bean (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) in Venezuela. *Viruses* 4:3804-3811. doi:10.3390/v4123804
- Brunt, A. A. and R. H. Kenten. 1973. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpeas (*Vigna unguiculata*) in Ghana. *Ann. Appl. Biol.* 74:67-74. doi:10.1111/j.1744-7348.1973.tb07723.x
- Brunt, A. A. and S. Phillips. 1981. 'Fuzzy vein', a disease of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in Western Nigeria induced by cowpea mild mottle virus. *Trop. Agric.* 58:177-180.
- Celli, M. G., M. C. Perotto, M. C. Merino, C. F. D. Nome, C. R. Flores, and V. C. Conci. 2016. First report of cowpea mild mottle virus in chia (*Salvia hispanica*). *Crop Prot.* 89:1-5. doi:10.1016/j.cropro.2016.05.014
- Chang, C. A. 1983. Rugose mosaic of asparagus bean caused by dual infection with cucumber mosaic virus and blackeye cowpea mosaic virus. *Plant Prot. Bull.* 25:177-190. (in Chinese with English abstract)
- Chang, C. A., D. E. Purcifull, and F. W. Zettler. 1990. Comparison of two strains of peanut stripe virus in Taiwan. *Plant Dis.* 74:593-596. doi:10.1094/PD-74-0593
- Chang, C. A., T. T. Yang, T. M. Tsan, and C. C. Chen. 1994. Production and application of virus free seeds to control virus diseases of asparagus beans. *Plant Prot. Bull.* 36:313-325. (in Chinese with English abstract)
- Chang, C. A., L. Y. Chien, C. F. Tsai, Y. Y. Lin, and Y. H. Cheng. 2013. First report of cowpea mild mottle virus in cowpea and French bean in Taiwan. *Plant Dis.* 97:1001. doi:10.1094/PDIS-10-12-0935-PDN
- 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. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475
- Demski, J. W. and C. W. Kuhn. 1989. Cowpea mild mottle virus. p.60-61. *in: Compendium of Soybean Diseases*. 3rd ed. (Sinclair, J. B. and P. A. Backman, eds.) American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 106 pp.
- Gonsalves, D. and M. Ishii. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 70:1028-1032. doi:10.1094/Phyto-70-1028
- Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein

- blotting. p.165–178. *in*: Methods in Molecular Biology™. Vol. 1. (Walker, J. M., ed.) Humana Press. Totowa, NJ. 355 pp. doi:10.1385/0-89603-062-8:165
- Hall, C. E. 1964. Electron microscopy: Principles and application to virus research. p.253–266. *in*: Plant Virology (Corbett, M. K. and H. D. Sisler, eds.) Univ. Florida Press. Gainesville, FL. 527 pp.
- Iizuka, N., R. Rajeshwari, D. V. R. Reddy, T. Goto, N. Muniyappa, N. Bharathan, and A. M. Ghanekar. 1984. Natural occurrence of a strain of cowpea mild mottle virus on groundnut (*Arachis hypogaea*) in India. *J. Phytopathol.* 109:245–253. doi:10.1111/j.1439-0434.1984.tb00714.x
- Iwaki, M., P. Thongmeearkom, M. Prommin, Y. Honda, and T. Hibi. 1982. Whitefly transmission and some properties of cowpea mild mottle virus on soybean in Thailand. *Plant Dis.* 66:365–368. doi:10.1094/PD-66-365
- Jeyanandarajah, P. and A. A. Brunt. 1993. The natural occurrence, transmission, properties and possible affinities of cowpea mild mottle virus. *J. Phytopathol.* 137:148–156. doi:10.1111/j.1439-0434.1993.tb01334.x
- King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier-Academic Press. San Diego, CA. 1338 pp.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Kuo, J. Y. 1995. Current status and prospects of leguminous vegetables industry in Taiwan. p.111–131. *in*: Proceedings of a Symposium on the Improvement of Vegetable Industry in Taiwan. December 1995. Taichung, Taiwan. Taichung District Agricultural Research and Extension Station, Taichung City, Taiwan. (in Chinese with English abstract)
- Mali, V. R. and D. D. Nirmal. 1987. Properties of a cowpea mild mottle virus isolate from groundnut. *Indian Phytopathol.* 40:22–26.
- Mansour, A., A. Al-Musa, H. J. Vetten, and D. E. Lese-mann. 1998. Properties of a cowpea mild mottle virus (CpMMV) isolate from eggplant in Jordan and evidence for biological and serological differences between CpMMV isolates from Leguminous and Solanaceous hosts. *J. Phytopathol.* 146:539–547. doi:10.1111/j.1439-0434.1998.tb04752.x
- Menzel, W., S. Winter, and H. J. Vetten. 2010. Complete nucleotide sequence of the type isolate of *Cowpea mild mottle virus* from Ghana. *Arch. Virol.* 155:2069–2073. doi:10.1007/s00705-010-0821-y
- Mink, G. I. and C. L. Keswani. 1987. First report of cowpea mild mottle virus on bean and mung bean in Tanzania. *Plant Dis.* 71:557. doi:10.1094/PD-71-0557F
- Mumo, N. N., G. E. Mamati, E. M. Ateka, F. K. Rimberia, G. O. Asudi, L. M. Boykin, E. M. Machuka, J. N. Njuguna, R. Pelle, and F. Stomeo. 2020. Metagenomic analysis of plant viruses associated with papaya ringspot disease in *Carica papaya* L. in Kenya. *Front. Microbiol.* 11:205. doi:10.3389/fmicb.2020.00205
- Muniyappa, V. and D. V. R. Reddy. 1983. Transmission of cowpea mild mottle virus by *Bemisia tabaci* in a non-persistent manner. *Plant Dis.* 67:391–393. doi:10.1094/PD-67-391
- Naidu, R. A., S. Gowda, T. Satyanarayana, V. Boyko, A. S. Reddy, W. O. Dawson, and D. V. Reddy. 1998. Evidence that whitefly-transmitted cowpea mild mottle virus belongs to the genus *Carlavirus*. *Arch. Virol.* 143:769–780. doi:10.1007/s007050050328
- 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. doi:10.1094/PDIS.1998.82.10.1121
- Purcifull, D. E. and D. L. Batchelor. 1977. Immunodiffusion Tests with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Treated Plant Viruses and Plant Viral Inclusions. *Tech. Bull. Fla. Agric. Exp. Sta. No. 788.* Agricultural Experiment Stations, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Gainesville, FL. 39 pp.
- Reddy, D. V. R. 1991. Groundnut viruses and virus diseases: Distribution, identification and control. *Rev. Plant Pathol.* 70:665–678.
- Rodriguez Pardina, P. E., J. D. Arneodo, G. A. Truol, P. S. Herrera, and I. G. Laguna. 2004. First record of cowpea mild mottle virus in bean crops in Argentina. *Austral. Plant Pathol.* 33:129–130. doi:10.1071/AP03076
- Rosario, K., H. Capobianco, T. F. F. Ng, M. Breitbart, and J. E. Polston. 2014. RNA viral metagenome of whiteflies leads to the discovery and characterization of a whitefly-transmitted *Carlavirus* in North America. *PLoS One* 9:e86748. doi:10.1371/journal.pone.0086748
- Shahraeen, N. 1989. Studies on a virus causing mosaic diseases of soybean (cv. MACS-13). *Indian Phytopathol.* 42:338.
- Thouvenel, J. C., A. Monsarrat, and C. Fauquet. 1982. Isolation of cowpea mild mottle virus from diseased soybeans in the Ivory Coast. *Plant Dis.* 66:336–337.

- doi:10.1094/PD-66-336
- Tzeng, S. S. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung City, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)
- Yadav, M. K., K. K. Biswas, S. K. Lal, V. K. Baranwal, and R. K. Jain. 2013. A distinct strain of cowpea mild mottle virus infecting soybean in India. *J. Phytopathol.* 161:739–744. doi:10.1111/jph.12119
- Zanardo, L. G. and C. M. Carvalho. 2017. Cowpea mild mottle virus (*Carlavirus*, Betaflexiviridae): A review. *Trop. Plant Pathol.* 42:417–430. doi:10.1007/s40858-017-0168-y

Identification and Biological Characteristics of Cowpea Mild Mottle Virus in Taiwan

Ying-Huey Cheng^{1*}, Chin-Chih Chen¹, Lan-Yi Chien², and Chin-An Chang³

Abstract

Cheng, Y. H., C. C. Chen, L. Y. Chien, and C. A. Chang. 2021. Identification and biological characteristics of cowpea mild mottle virus in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 70(1):67–79.

Sample plants of asparagus bean and French bean bearing putatively viral symptoms were found in vegetable gardens in Chiayi and Nantou Counties, Taiwan. The symptomatic plants were mechanically inoculated to *Chenopodium quinoa* and two virus isolates, cowpea mild mottle virus (CpMMV)-V and CpMMV-P, were isolated after 3 times of single lesion isolation. The virus sources were established by inoculating local lesions to *C. quinoa* or *Nicotiana benthamiana*. By back-inoculation, plants of asparagus bean and French bean developed symptoms similar to those found in the field. When two isolates were inoculated on other legume crops, there was no obvious dwarfing or stunting in the whole plant, but some mild symptoms such as mottle and yellow spots can be seen on leaves. CpMMV has not been detected to be transmitted through seeds by growing out test. Total RNAs extracted from diseased asparagus bean and French bean used as templates, and reverse transcription-polymerase chain reaction were performed with degenerate primers for potyviruses (Hrp5/Pot1). Unexpectedly, an 1 Kb of DNA product was amplified. Comparing with gene sequences on GenBank, sequences of this amplified DNA includes part of the 3' end of the coat protein gene of CpMMV. The complete coat protein gene was cloned with specific primers based on the reported sequences and then for sequence analysis. The coat protein gene of CpMMV-V (JX070669) and CpMMV-V (JX020701) shared 88.8% and 97.6% sequence identities of nucleotide and amino acid, respectively. Comparing with other coat protein genes of CpMMV, the nucleotide sequence identity is 98.7–75.7%, and the amino acid sequence identity is 97.9–91.3%. Electron micrographs showed that carlavirus-like particles were found in the leaf dips of infected asparagus bean and French bean samples. The coat protein obtained by partially purified viral particles and through sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used for antiserum preparation. The antiserum was available for Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), especially are suitable for field detection and investigation. Therefore, we found that CpMMV is commonly infected French bean in middle Taiwan. In addition to asparagus bean and French bean, whether CpMMV affects other leguminous crops needs more investigation.

Key words: Cowpea mild mottle virus (CpMMV), Coat protein, Antisera.

Received: November 24, 2020; Accepted: December 23, 2020.

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

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

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

³ Professor, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung City, Taiwan, ROC.