

混合兩種百香果病毒 East Asian Passiflora Virus 多元抗體 以提升百香果不同馬鈴薯 Y 屬病毒之廣效性檢測

陳金枝^{1*} 江芬蘭² 鄭櫻慧¹ 廖家翌²

摘要

陳金枝、江芬蘭、鄭櫻慧、廖家翌。2022。混合兩種百香果病毒 East Asian Passiflora virus 多元抗體以提升百香果不同馬鈴薯 Y 屬病毒之廣效性檢測。台灣農業研究 71(2):101–121。

罹染病毒的百香果若出現果實木質化病徵，造成畸形變小、果汁率低、風味變差，對品質與產量影響甚大。在台灣，East Asian Passiflora virus (EAPV) AO 與 IB 系統及 Telosma mosaic virus (TeMV) 為可感染百香果之 3 種主要的馬鈴薯 Y 屬 (*Potyvirus*) 病毒。本研究以細菌合成系統分別誘導表現 EAPV-AO 和 EAPV-IB 鞘蛋白 (coat protein; CP) 作為抗原，經免疫注射後製備出具有廣效檢測 19 種不同馬鈴薯 Y 屬病毒之多元抗體，分別稱之為 Anti-EAPV-AOCP 和 Anti-EAPV-IBCP，並於間接式-酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 檢測中發現以此二抗體等比例混合 (稱之為 Anti-EAPVmix) 進行檢測，也可用於檢出台灣及泰國的百香果 TeMV，並提升對 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 等 3 種病毒的檢出率。應用 Anti-EAPVmix 檢測病毒在百香果植株枝條上之分布顯示，以近新芽之枝條上段部位葉片所測得之病毒檢出率較高，適合作為提升檢出病毒之採樣部位。本研究顯示混合兩種 EAPV 的多元抗體，一次檢測即可達到監測至少 3 種台灣主要的百香果 *Potyvirus* 屬病毒，並可擴及其他不同的 potyvirus，且可節省檢測所需耗材和降低成本之效益，可強化對田間百香果病毒發生的監測及健康種苗的病毒檢測內控機制。

關鍵詞：百香果 potyvirus 病毒、多元抗體、抗體混合液、廣效性檢測。

前言

百香果 (*Passiflora* spp.) 為西番蓮科 (Passifloraceae) 西番蓮屬 (*Passiflora*) 的多年生蔓性植物，原生於南美洲巴西等熱帶美洲地區。百香果有『果汁之王』稱號，具有高經濟價值，在全球果汁工業上具有重要地位。「台農 1 號」為國內百香果之主力品種，以嫁接苗作為種苗繁殖生產及銷售主力。國內百香果栽培面積逐年增加，2020 年已達 894 ha，鮮果產量 28,526 Mg，產值達 12.8 億元。但栽培過程中容易遭受病毒、真菌、蟲害等危害，尤以引起果實木質化之病毒影響百香果生育及產值最鉅 (Liberato & Zerbini n.d.)，因此種苗之無特定病毒

檢測從源頭控管健康品質，乃確保百香果產值之重要關鍵。

國際間百香果的病毒種類，紀錄上約有 20 種，涵蓋 *Carlavirus*、*Cucumovirus*、*Cilevirus*、*Nepovirus*、*Potyvirus*、*Rhabdovirus*、*Tobamovirus* 及 *Tymovirus* 屬之病毒 (Liberato & Zerbini n.d.; Spiegel *et al.* 2007; Parrella & Lanave 2009; Coutts *et al.* 2011; Song & Ryu 2011; Nakasato *et al.* 2020)。亞洲地區已知百香果病毒種類，包括 (1) 2 種東亞百香果病毒 (East Asian Passiflora virus; EAPV)：EAPV-AO 類群主要引起葉片嵌紋和果實木質化 (Iwai *et al.* 2006a)；EAPV-IB 類群引起斑駁或輕微嵌紋病徵 (Chang 1992; Fukumoto *et al.* 2012)；

投稿日期：2021 年 8 月 17 日；接受日期：2021 年 11 月 25 日。

* 通訊作者：chinzue@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計畫助理。台灣 台中市。

(2) 豇豆蚜傳嵌紋病毒 (cowpea aphid-borne mosaic virus; CABMV)，即以往台灣學者發表引起漣葉徵狀的百香果漣葉病毒 (passionfruit crinkle virus; PCV) (Chang & Lin 1989)；但僅於當年偶發之病例，後續未再於台灣百香果上發現此病毒 (Chang *et al.* 2017)；(3) 胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic virus; CMV) 引起葉片黃斑病徵 (Liberato & Zerbini n.d.)；(4) 夜香花嵌紋病毒 (Telosma mosaic virus; TeMV 或 TelMV) 為泰國近年於百香果上發現的病毒 (Chiemsombat *et al.* 2014)，引起葉片嵌紋、果皮嵌紋和木質化病徵；(5) 二種 *Begomovirus* 屬病毒：包含聖誕紅捲葉病毒 (Euphorbia leaf curl virus; EuLCV) 及木瓜捲葉廣東病毒 (papaya leaf curl Guangdong virus; PaLCuGDV)，首次由台灣學者報導可發生於百香果 (Cheng *et al.* 2014)，常伴隨於寒流低溫氣候下發病而引起葉片嵌紋皺縮，氣溫回暖後新生的葉片恢復無病徵。EuLCV 在中國大陸 (Ma *et al.* 2004) 和南韓 (Kil *et al.* 2016) 均有發生；PaLCuGDV 於 2004 年由中國大陸學者首次報導 (Wang *et al.* 2004)，因此在中國大陸和台灣均有發生。

上述之 EAPV-AO、EAPV-IB、TeMV 和 CABMV 均屬於馬鈴薯 Y 屬病毒 (*Potyvirus*) 成員；近年，越南當地學者於 2018 年在美国國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 登錄一種新興的馬鈴薯 Y 屬病毒，可感染當地百香果造成葉片斑駁病徵，將其命名為 *Passiflora mottle virus* (PaMV) (accession no. MG087836)；然而，依照國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 以全長度核酸定序為分類依據，與目前已登錄於 NCBI GenBank 的 *passionfruit Vietnam virus* (PVNV-DakNong; accession no. MH286883) 為相同病毒 (Chong *et al.* 2018; Do *et al.* 2021)。台灣百香果並未由此病毒發生。

木質化為影響百香果生育之主因，目前國際間引起百香果木質化的病毒種類包括澳洲的 *passionfruit woodiness virus* (PWV) (Wylie & Jones 2011)、巴西的 CABMV (Nascimento *et al.* 2006)、泰國的 TeMV (Chiemsombat *et al.*

2014)；而日本、台灣、中國大陸和東南亞等亞洲地區主要為 EAPV 感染所引起 (Iwai *et al.* 2006b; Chong *et al.* 2018)；引起台灣嚴重型木質化病徵之主要病毒為 EAPV-AO 系統 (Chang *et al.* 2017; Chong *et al.* 2018) 和 2017 年發現之 TeMV (Chen *et al.* 2019; Tsai 2019)。

TeMV 首次於 2008 年越南夜香花 (*Telosma cordata*) 上被發現 (Ha *et al.* 2008)，文獻上紀錄的 TeMV 寄主包括有夜香花 (Ha *et al.* 2008)、廣藿香 (*Pogostemon cablin*) (Noveriza *et al.* 2012)、翼柄決明 (*Senna alata* L.) (Yao *et al.* 2019) 和百香果 (Chiemsombat *et al.* 2014; Lixue *et al.* 2017; Chen *et al.* 2018b; Yang *et al.* 2018)。近年於泰國 (Chiemsombat *et al.* 2014) 和中國大陸 (Lixue *et al.* 2017; Chen *et al.* 2018b; Yang *et al.* 2018; Xie *et al.* 2020) 陸續證實 TeMV 也會引起百香果木質化病徵，影響百香果之果實品質。Lee *et al.* (2020) 以往於 2017–2019 年期間在台灣田間百香果產地的調查結果顯示 TeMV 已普遍存在台灣田間，檢出率大約在 32.1–35.8%，但仍屬零星發生。

免疫檢測法中的酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 應用於植物病毒之檢測，具有可一次大量篩檢樣品的優點 (Clark & Adams 1977; Clark 1981; Koenig & Paul 1982; Baranwal *et al.* 2020)。近年來高靈敏度的核酸檢測技術應用，可以提升對病毒檢測的準確度，但在田間對病毒病的大量調查監測及產業貿易流通上的檢疫，免疫檢測法仍為最適合者。因此，開發可提升免疫檢測法的病毒多元抗體，並配合適當的取樣部位，可達到提升病毒檢出率的效果。

本研究利用細菌生合成系統分別表達 EAPV-AO 和 EAPV-IB 的鞘蛋白 (coat protein; CP) 做為抗原，製備對應同源病毒之多元抗體，探討其對不同百香果 *potyviruses* 病毒之檢測效果，並分析以混合兩者抗體方式進行 indirect ELISA 時對提升病毒檢出率的成效，另探討 EAPV 系統的病毒在罹病植株枝條上之分布差異，以建立最適合免疫檢測的取樣部位，綜合免疫檢測法與適當取樣技術以提升對百香果病毒的檢測準確度。

材料與方法

罹染病毒之病組織

台灣來源之百香果罹病組織

本研究採用 2017–2020 年期間，由國內的南投埔里以及台中霧峰區和後里區田間檢出 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 之百香果葉片組織，先行以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 確認其單獨或複合感染狀態 (Lee *et al.* 2020)，作為供試材料。

泰國來源之百香果罹病組織

2019 年 3 月透過當地學者協助於泰國之曼谷 (Bangkok)、清邁 (Chiang Mai) 和清萊 (Chiang Rai) 等地之百香果田區採取葉片嵌紋徵狀者，樣品乃透過行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之『特定植物檢疫物及物品輸入辦法』核准輸入 (輸入許可證號 108-V-500)，於隔離管制規範條件下進行病毒鑑定之相關試驗。試驗完畢依規定以高溫高壓滅菌法 (121°C、20 min) 將材料進行消毒與銷毀。

越南來源之百香果罹病組織

2019 年 11 月於越南之嘉萊省 (Gia Lai) 和大叻 (Đà Lạt) 等地，在當地種苗貿易商協助下於農民客戶種植的百香果田區採取葉片出現嵌紋徵狀者，樣品乃透過行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之『特定植物檢疫物及物品輸入辦法』核准輸入 (輸入許可證號 108-V-582)，於隔離管制規範條件下進行病毒鑑定之相關試驗。試驗完畢依規定以高溫高壓滅菌法 (121°C、20 min) 將材料進行消毒與銷毀。

應用細菌合成系統表現病毒 CP 及其多元抗體製備

本試驗使用於田間採集並以 RT-PCR 確認為單獨感染 EAPV-AO 和 EAPV-IB 的百香果罹病組織進行之。

病毒 CP 核酸片段之選殖與定序分析

核酸純化：取 0.1 g 之受測罹病組織樣品，依據商業化植物核酸微量萃取試劑組 (Plant

Total RNA mini Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corporation, Taipei, Taiwan) 之步驟，進行供試植物組織樣品全量核糖核酸 (total RNA) 之萃取。

單步驟 RT-PCR 法：以純化所得之 RNA 為模板，利用 *Potyvirus* 病毒之簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ (5'ATGATHGARKCNTGGGG3'/5'GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTT3') (Pappu *et al.* 1998; Chen *et al.* 2006) 進行病毒基因體 3' 端約 1.3 kbp 核酸片段之單步驟 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 (Biometra T3000 Thermocycler, Analytik Jena, Unterschleißheim, 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 2 min；之後進行 26 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 1 min、52°C 下煉合 50 s、72°C 下聚合 1 min 30s，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：以 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ 引子對所增幅出的 1.3 kbp 核酸片段，選殖於 pGEM-T Easy Vector Systems 載體上 (Promega, Madison, WI, USA)，篩選出含有此特定嵌入序列 (insert sequence) 的選殖株送交核酸定序公司 (明欣生物科技有限公司，台灣台北市)，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列。所得序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Wisconsin, USA) 分析軟體進行分析，並與 NCBI GenBank 已登錄的 EAPV CP 核苷酸和胺基酸序列進行比對分析，確認本研究病毒試驗株之 CP 核苷酸序列。

病毒分離株 CP 基因之蛋白質表現及多元抗體製備

依據兩種 EAPV 的 CP 序列定序結果，針對可增幅病毒全長度 CP 核苷酸序列，設計

EAPV-AO 和 EAPV-IB 的專一性引子對如下：(1) AOCp-u/AOCp-d [5'-TACCATGGGCACCAAATCAGAA AATGAC-3' (劃底線者為 *NcoI* 切位)/5'-CCTCGAGTCACTGCGGGGAATTCATA-3' (劃雙底線者為 *XhoI* 切位)]；(2) IBCP-u/IBCP-d [5'-ACCATGGGCTCATTCACTGGAAAAG-3' (劃底線者為 *NcoI* 切位)/5'-GCTCGAGTACTGCGGAGGAACCAT-3' (劃雙底線者為 *XhoI* 切位)]；以單獨罹染 EAPV-AO 或 EAPV-IB 之百香果葉片組織全量 RNA 為模板，參照上述 RT-PCR 反應條件，以其對應之 CP 表現用引子對，於 50°C 下煉合，26 個 PCR 循環增幅，以增幅病毒之全長度 CP 供表現載體選殖用。

將增幅所得之 EAPV-AOCp 和 EAPV-IBCP 核酸片段以 *NcoI* 和 *XhoI* 切割，剪接於同樣經 *NcoI* 和 *XhoI* 切割之 pET28a(+) 載體 (Novagen, Inc., Madison, WI, USA)，經選殖後所獲得之質體 pET-EAPV-AOCp 和 pET-EAPV-IBCP 分別轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 進行表現蛋白誘導與純化，相關試驗方法參照以往研究報告進行 (Li *et al.* 1998; Chen *et al.* 2018a)。純化後的病毒表現蛋白沉澱物以 pH 8.0 之 Tris-EDTA 緩衝液溶解均勻，並進行 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 電泳分析，再經西方墨點法 (western blotting) 以市售 *Potyvirus* 單元抗體 (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 確認帶有免疫反應之病毒 CP 表現株，以確認 EAPV-AOCp 和 EAPV-IBCP 之表現。西方墨點法試驗步驟參照以往研究報告進行 (Chen *et al.* 2018a)。

進一步選用有表現 EAPV-AOCp 和 EAPV-IBCP 之 pET 選殖株，參照以往研究報告進行大量表現蛋白之誘導與純化 (Li *et al.* 1998; Chen *et al.* 2018a)，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股份有限公司 (台灣桃園市) 進行每週 1 次、每次注射 1 mg 之純化表現蛋白，連續 4 wk 的兔免疫注射，第 5 週起由兔耳朵進行靜脈採血，每次採約 30–40 mL 以獲得多元抗體。

EAPV-AOCp 和 EAPV-IBCP 多元抗體之檢測效果評估

EAPV-AOCp 和 EAPV-IBCP 多元抗體對不同 potyviruses 之檢測效果

本試驗參照前述 indirect ELISA 方法 (Clark & Adams 1977; Chang *et al.* 1988; Chen *et al.* 2018a) 進行受測樣品與 EAPV-AOCp 和 EAPV-IBCP 多元抗體之反應。取 0.1 g 罹病葉組織進行試驗。

Indirect ELISA 法：首先以此免疫檢測法評估本研究所自製的多元抗體之檢測效果，以 EAPV-AOCp、EAPV-IBCP 以及經等比例混合之 EAPV-AOCp/EAPV-IBCP (稱之為 Anti-EAPVmix) 多元抗體等 3 種組合，分別稀釋 1,000× 液後，再與受測樣品進行反應，樣品來源包括 2017–2020 年於國內田間百香果田區採集之單獨罹染 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 之分離株、毛西番蓮 (*Passiflora foetida*) 分離株 EAPV-AO-PF1、泰國與越南之百香果 potyvirus 病毒株、本研究室保存之不同 *Potyvirus* 屬病毒罹病組織 (表 1)；文獻記錄上可感染百香果之其他種 potyviruses (Fischer & Rezende 2008; Parrella & Lanave 2009)，則以本研究室保存者替代之，包括 CABMV (Chang & Lin 1989)、bean yellow mosaic virus (BYMV) (Chen *et al.* 1999)、Passiflora virus Y (PaVY 豇豆分離株) (鄭櫻慧博士提供) 和 soybean mosaic virus (SMV 大豆分離株)。

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，加入 96 孔 enzyme immunoassay (EIA) 反應盤內 (100 μL/孔)，進行 indirect ELISA 檢測；呈色反應以 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-Nitrophenyl phosphate; p-NPP) (Amresco, Solon, OH, USA) 進行。反應 30–35 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

表 1. 利用細菌表現之 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 和 EAPV-IB 融合性鞘蛋白所製備的多元抗體於間接式酵素連結免疫吸附法檢測不同 *Potyvirus* 病毒之效果。

Table 1. Detection effectiveness of the polyclonal antibodies against the bacterial-expressed fusion coat proteins of East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB reacted with different potyviruses in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Virus-infected sample ^z	ELISA reading (A_{405nm}) ^y		
	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPVmix ^x
East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO-Tw			
EAPV-AO-Tw	1.786	1.305	1.625
EAPV-AO-PF1	1.356	0.918	1.490
EAPV-IB-Tw	1.954	2.401	2.669
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)	0.272	0.750	0.608
Telosma mosaic virus (TeMV)			
TeMV-Tw	0.592	0.849	1.101
TeMV-TL	0.602	0.808	0.892
Passionfruit Vietnam virus (PVNV)-VN	0.333	0.583	0.735
Passiflora virus Y (PaVY)	1.455	2.159	2.173
Soybean mosaic virus (SMV)	1.283	1.333	2.143
Bean yellow mosaic virus (BYMV)	0.408	1.151	1.337
Bean common mosaic virus (BCMV)-BICM	0.795	0.922	0.819
Potato virus Y (PVY)-potato	0.582	1.015	0.673
Papaya ringspot virus (PRSV)	1.217	2.045	2.018
Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	0.701	1.694	1.614
Maize dwarf mosaic virus (MDMV)	0.922	1.251	1.568
Butterfly flower mosaic virus (BFMV)	0.245	1.033	1.457
Ornithogalum mosaic virus (OrMV)-Or1	0.644	0.851	1.217
Turnip mosaic virus (TuMV)-YC5	0.194	0.289	0.365
Bidens mottle virus (BiMV)-Leu	0.265	0.941	1.056
Zantedeschia mild mosaic virus (ZaMMV)	0.496	1.031	0.957
Konjac mosaic virus (KoMV)	0.092	0.159	0.177
Dasheen mosaic virus (DMV)	0.063	0.147	0.115
Lycoris potyvirus	0.240	0.261	0.329
Lily mottle virus (LMoV)	0.088	0.330	0.410
D-CK	2.972	2.625	2.955
2H-CK	0.108	0.182	0.190

^z Tested potyviruses are collected and preserved materials in the laboratory. TeMV-TL was collected from Thailand's passion fruit fields in 2019. PVNV-VN was collected from Vietnam in 2019. EAPV-AO-PF1 was collected from *Passiflora foetida*.

^y The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered undetectable. The bacterial-expressed viral proteins are used as positive controls (D-CK).

^x Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

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。

另以於西方墨點法中，選用 EAPV-AO、

EAPV-IB、CABMV、BYMV、PaVY、SMV 和 TeMV 進行反應，評估上述單獨或混合式等 3 種抗體組合對受測樣品的反應性。

病毒多元抗體檢測敏感度分析

本試驗分別以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IB-CP 多元抗體，以及 Anti-EAPVmix 抗體等 3 種組合，加上以往已完成之 TeMV-CP 多元抗體 (Lee *et al.* 2020)，以稀釋 1,000× 液進行檢測敏感度之比較分析。

將單獨罹染 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 之百香果罹病組織，取 0.1 g 組織先行以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨後，再以此緩衝液經 5× 系列稀釋至 5⁻⁸ 的樣品液，各稀釋液分別取定量 (100 μ L well⁻¹) 加入 96 孔 EIA 反應盤內，每樣品加 2 孔為 2 重複，進行 indirect ELISA 反應；最終進行 35 min 之呈色反應。樣品吸光值大於 2 倍之健康葉片吸光值者，視為正反應。

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體及其抗體混合液對百香果罹病組織之檢測效果

為評估以單獨 EAPV-AOCP 或 EAPV-IB-CP 多元抗體及 Anti-EAPVmix 抗體對百香果病毒罹病組織之檢出效果，本試驗將受測樣品數放大，選用單獨罹染受測病毒之百香果罹病組織包括 EAPV-AO 有 23 個、EAPV-IB 有 27 個和 TeMV 有 30 個；其中 TeMV 百香果分離株包括有台灣分離株 21 個和泰國分離株 9 個，乃分別屬於不同地理類緣關係者 (Lee *et al.* 2020)。每種受測樣品均分別與上述 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 多元抗體和抗體混合液 Anti-EAPVmix 等 3 種抗體組合進行 indirect ELISA 檢測，分析被檢出病毒的樣品數。而 TeMV 罹病樣品則加測與 TeMV-CP 多元抗體 (Lee *et al.* 2020) 之反應，以做為 TeMV-CP 多元抗體檢出病毒之正反應對比。

以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體混合液檢測百香果罹病枝條之病毒分布

檢取確認有罹染 EAPV-AO 或 EAPV-IB 之百香果枝條共 51 條，以新芽端起始，將枝條依序劃分為上、中、下三段，分別採樣每區段上之葉片和莖部組織各 0.2 g，以 6 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (pH 9.6) 研磨均勻後，加入 96 孔 EIA 反應盤內 (100 μ L/孔)，以抗體

混合液 Anti-EAPVmix 進行 indirect ELISA 檢測試驗，評估各不同枝條部位上葉片及莖部組織的病毒分布差異。

以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體混合液檢測台灣田間百香果罹病樣品之效果

由上述已建立的最適當取樣部位進行採樣，以 indirect ELISA 法檢測南投縣埔里大坪頂百香果栽培區之 12 個田區和後里 1 個田區的百香果葉片樣品，進行病毒病發生調查。分別以 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 和抗體混合液 Anti-EAPVmix 等 3 組多元抗體進行檢測，評估對田間百香果病毒的檢出率。

結果

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 融合性蛋白表現及其多元抗體檢測評估

EAPV-AO 和 EAPV-IB 之 CP 表現蛋白免疫檢測結果：本研究針對 EAPV-AO 和 EAPV-IB 全長度 CP 核酸片段分別所構築之 pET-EAPV-AOCP 和 pET-EAPV-IBCP 選殖株，在 *E. coli* Rosetta (DE3) 宿主內以 1 mg mL⁻¹ 之 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質之表現，兩者均均包含有部分 pET28a(+) 表現載體的融合性蛋白，表現蛋白分子量預估分別為 EAPV-AOCP 約為 37 kDa、EAPV-IBCP 約為 33 kDa，於 SDS-PAGE 電泳分析中均可見其融合性表現蛋白分子量，與預估相符且為不帶有病毒核酸嵌入序列的 pET28a(+) 表現載體所有 (圖 1A)。於西方墨點法中，市售 *Potyvirus* 病毒的單元抗體可與 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 表現蛋白產生正反應 (圖 1B)，顯示本研究之 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 表現蛋白均具有 *Potyvirus* 病毒之抗原特性；進一步分別以各自的表現蛋白為抗原所製成之多元抗體，由西方墨點法分析結果，顯示可分別與其同源的表現蛋白 (EAPV-AOCP/37 kDa、EAPV-IBCP/33 kDa) 產生正反應 (圖 1C)。

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體對不同 potyviruses 的檢測效果：本研究所製備的 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體，除可

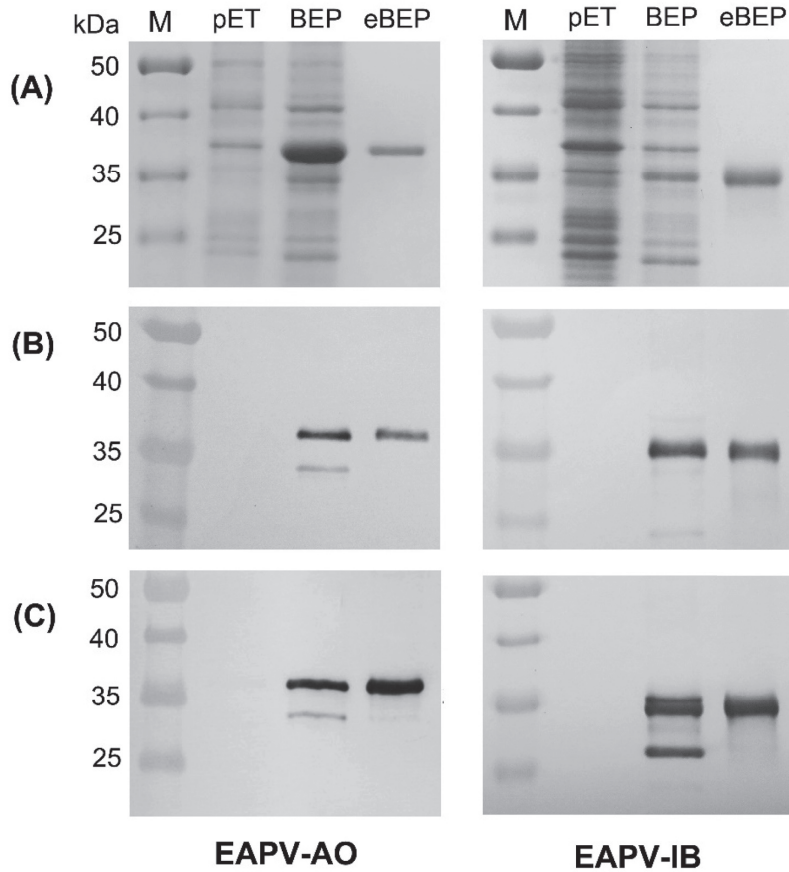


圖 1. 應用細菌大量表現的 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 和 EAPV-IB 融合性表現蛋白之 (A) SDS-PAGE 電泳及 (B、C) 西方墨點法分析。(A) SDS-PAGE 蛋白質電泳圖，病毒鞘蛋白之融合性表現蛋白分子量預估分別為 EAPV-AO/37 kDa 和 EAPV-IB/33 kDa。受測樣品分別與 (B) Agdia 公司出品之 *Potyvirus* 單元抗體 (C) 自製之 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28a(+) 蛋白 (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. 1. (A) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and (B, C) western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB. (A) The bacterial-expressed fusion proteins of EAPV-AO (37 kDa) and EAPV-IB (33 kDa) (lane eBEP) were observed by SDS-PAGE. (B) The monoclonal antibody to *Potyvirus* purchased from Agdia, and (C) the polyclonal antibodies to EAPV-AO CP and EAPV-IB CP prepared in this study were used to react with the bacterial-expressed viral CPs. Lane M: protein markers; lane pET: IPTG-induced bacterial cell lysate containing the empty vector pET28a(+); lane BEP: IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with viral CP insert; and lane eBEP: the purified bacterial-expressed CPs of EAPV-AO and EAPV-IB, respectively.

與其同源的融合性蛋白產生正反應外 (圖 1C)；也可於 indirect ELISA 法中分別與下列樣品產生正反應 (表 1)，包括 (1) 同源病毒之融合性蛋白 (D-CK)；(2) 百香果 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 罹病組織；TeMV 包含台灣 (Tw) 和泰國 (TL) 分離株；(3) 毛西番蓮 EAPV-AO-

PF1 分離株；(4) 記錄上可感染百香果之其他種 potyviruses 包括 BYMV、CABMV、PaVY 豆類分離株、SMV 及越南新興百香果病毒 PVNV-VN；(4) 其他受測試之不同 potyviruses (表 1)。本結果顯示所製備出之 2 種 EAPV 分離株之多元抗體，均可檢出至少 19 種受測

試的不同 potyviruses，具有廣效性檢測同屬病毒的效果。而以等比例混合的 EAPV-AOCP/EAPV-IBCP 多元抗體 (Anti-EAPVmix)，同樣具有廣效性檢出 19 種受測 potyviruses 樣品的效果 (表 1)。

進一步於西方墨點法分析結果顯示：本研究之 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 多元抗體及其

抗體混合液 Anti-EAPVmix 對於文獻記錄上可感染百香果之不同 *Potyvirus* 屬病毒 (圖 2) 包括 EAPV-AO、EAPV-IB、CABMV、BYMV、PaVY、SMV 和 TeMV 於對應病毒 CP 的條帶上均產生正反應，顯示此等抗體於 indirect ELISA 對上述受測樣品產生正反應者，確實是與受測病毒分子產生反應之結果。

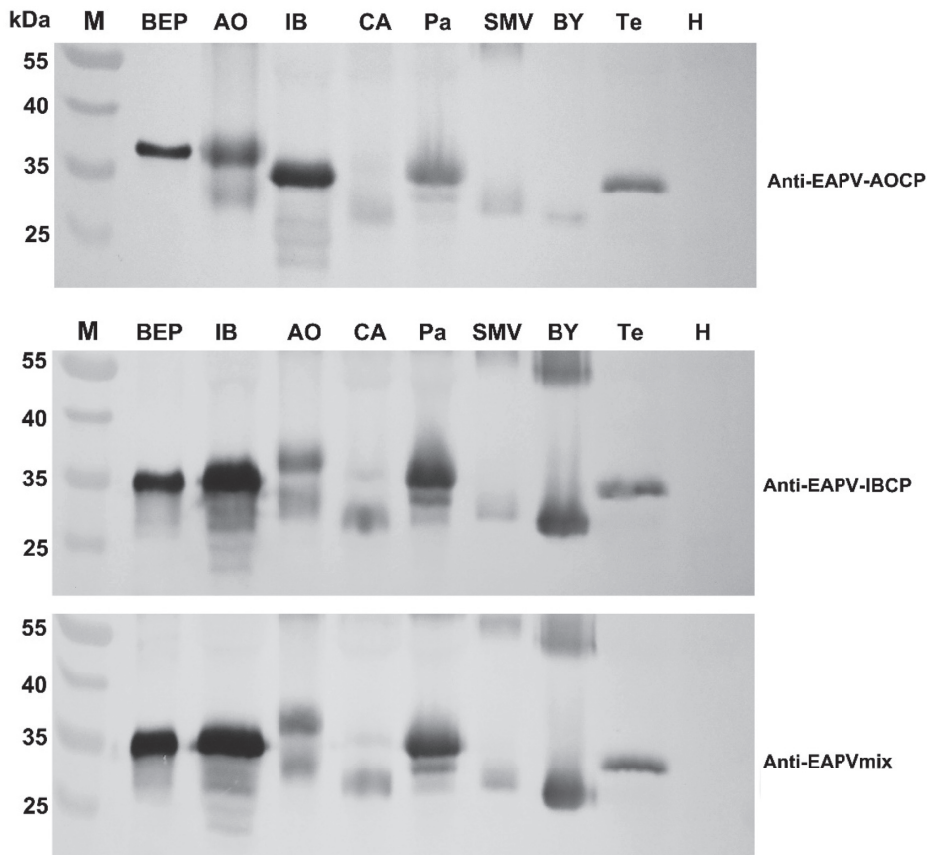


圖 2. 以西方墨點法分析 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 和 EAPV-IB 多元抗體及其抗體混合液對不同馬鈴薯 Y 屬病毒之反應。受測樣品分別與多元抗體 Anti-EAPV-AOCP、Anti-EAPV-IBCP 以及此兩種病毒抗體等比例混合者 (Anti-EAPVmix) 進行反應。行 M：蛋白質分子量標幟；行 BEP：細菌表現之 pET28a(+) 病毒鞘蛋白正對照；不同罹病組織包括：行 AO (EAPV-AO)、行 IB (EAPV-IB)、行 CA (cowpea aphid-borne mosaic virus; CABMV)、行 Pa (Passiflora virus Y; PaVY)、行 SMV (soybean mosaic virus; SMV)、行 BY (bean yellow mosaic virus; BYMV)、行 Te (Telosma mosaic virus; TeMV)；行 H：健康百香果葉片組織。

Fig. 2. Analysis of the polyclonal antibodies of East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO, EAPV-IB and their mixture reacted to different potyviruses in western blotting assay. Samples were reacted to the antibodies of Anti-EAPV-AOCP, Anti-EAPV-IBCP and Anti-EAPVmix (the mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP at equal ratio), respectively. Lane M: protein markers; lane BEP, IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with viral CP insert; different virus-infected passiflora leaf tissues including: lane AO (EAPV-AO), lane IB (EAPV-IB), lane CA (cowpea aphid-borne mosaic virus; CABMV), lane Pa (Passiflora virus Y; PaVY), lane SMV (soybean mosaic virus; SMV), lane BY (bean yellow mosaic virus; BYMV) and lane Te (Telosma mosaic virus; TeMV); lane H: the healthy passiflora tissues.

病毒多元抗體檢測敏感度分析

於 indirect ELISA 檢測中，以高於健康對照的 ELISA 讀值 (A_{405nm}) 2 倍判讀為正反應之依據，本試驗分別以 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 多元抗體和抗體混合液 (Anti-EAPVmix) 進行對檢出受測樣品的敏感度。以 EAPV-AOCP 多元抗體而言，對其同源病毒 EAPV-AO 具有較高之檢測敏感度，可達樣品稀釋倍數的 5^{-8} ，此檢測敏感度分別高於對檢測 EAPV-IB 和 TeMV 的 $5\times$ 和 $25\times$ (表 2)；以 EAPV-IBCP 多元抗體而言，對其同源病毒 EAPV-IB 也具有較高之檢測敏感度，可達樣品稀釋倍數的

5^{-7} ，此檢測敏感度分別高於對檢測 EAPV-AO 和 TeMV 的 $5\times$ 和 $25\times$ (表 2)；以抗體混合液 Anti-EAPVmix 而言，均可檢出 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV，且可檢出各種受測病毒樣品的稀釋倍數至少可達到 5^{-6} (表 2)；本試驗另測試以往已研製的 TeMV-CP 多元抗體，均可檢出 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 百香果罹病組織，可檢出各種受測病毒樣品的稀釋倍數至少可達到 5^{-6} (表 2)。本研究進一步顯示 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 和 TeMV-CP 多元抗體對彼此之病毒抗原均有免疫反應性，雖無法做為專一性抗體，但具有廣效性檢測的成效。

表 2. 以細菌表現之 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 和 EAPV-IB 融合性鞘蛋白製備出之多元抗體對檢測同源抗原和 Telosma mosaic virus (TeMV) 之敏感度分析。

Table 2. Sensitivity detection of the polyclonal antibody against bacterial expressed fusion coat proteins of East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB reacted to their original virus and Telosma mosaic virus (TeMV).

Antigen ^z	ELISA reading (A_{405nm}) of series dilutions of antigen ^y							
	5^{-1}	5^{-2}	5^{-3}	5^{-4}	5^{-5}	5^{-6}	5^{-7}	5^{-8}
Reacted with Anti-EAPV-AOCP								
EAPV-AO	1.254	2.198	2.097	1.442	0.590	0.251	0.116	<u>0.106</u>
EAPV-IB	0.733	1.692	1.542	1.043	0.725	0.164	<u>0.097</u>	0.039
TeMV	0.804	1.032	0.561	0.219	0.151	<u>0.114</u>	0.067	0.071
2H-CK	0.180	0.064	0.098	0.074	0.046	0.072	0.074	0.090
Reacted with Anti-EAPV-IBCP								
EAPV-AO	0.894	1.643	1.550	1.213	0.554	<u>0.206</u>	0.136	0.150
EAPV-IB	1.650	2.149	2.285	2.249	1.363	0.444	<u>0.242</u>	0.162
TeMV	1.231	1.407	0.863	0.491	<u>0.350</u>	0.179	0.148	0.094
2H-CK	0.102	0.072	0.076	0.088	0.142	0.196	0.208	0.230
Reacted with Anti-TeMVCP								
EAPV-AO	0.592	1.505	1.466	1.365	0.872	0.301	<u>0.198</u>	0.101
EAPV-IB	0.539	1.293	1.336	1.206	0.886	0.408	<u>0.189</u>	0.122
TeMV	2.252	2.602	2.254	1.557	1.007	<u>0.316</u>	0.144	0.094
2H-CK	0.144	0.060	0.068	0.070	0.100	0.108	0.178	0.162
Reacted with Anti-EAPVmix ^x								
EAPV-AO	1.753	2.430	2.347	1.951	1.269	<u>0.568</u>	0.315	0.288
EAPV-IB	1.608	2.445	2.476	2.486	1.922	0.675	<u>0.356</u>	0.256
TeMV	1.419	1.785	1.773	0.645	0.489	<u>0.281</u>	0.232	0.224
2H-CK	0.058	0.046	0.064	0.098	0.166	0.182	0.334	0.360

^z Tested antigens are the diseased passiflora leaves individually infected by East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO, EAPV-IB and Telosma mosaic virus (TeMV).

^y The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered undetectable. The underlined value means the endpoint of positive detection by tested polyclonal antibody.

^x Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體及其抗體混合液提升罹病組織病毒檢出率之效果

本試驗以單獨感染 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 之百香果罹病組織為受測對象，並放大檢測樣品數，用於評估單獨以 EAPV-AOCP 或 EAPV-IBCP 多元抗體、或抗體混合液 An-

ti-EAPVmix 對檢出罹病組織上特定病毒的效果，以釐清 Anti-EAPVmix 對檢測大量樣品的實際效益。由檢測結果顯示：(1) 對檢測 EAPV-AO 罹病組織而言 (表 3)，受測的 23 個樣品均能以 EAPV-AOCP 多元抗體或 Anti-EAPVmix 檢出，而正反應樣品的 ELISA 讀值平均值，則以 Anti-EAPVmix 檢出者為 0.616，高於單獨以 EAPV-AOCP 抗體檢出的 0.454；若以

表 3. 以 indirect ELISA 法和不同抗體檢測單獨罹染 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 之百香果罹病組織。
Table 3. Detection of the East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO infected passiflora tissues by different polyclonal antibodies in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

EAPV-AO isolate ^z	ELISA reading (A_{405nm}) of samples detected with ^y		
	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPVmix ^x
1	0.666	0.145	0.715
2	0.530	0.099	0.613
3	0.517	0.246	0.608
4	0.282	0.107	0.293
5	0.292	0.126	0.385
6	0.770	0.384	1.196
7	0.432	0.177	0.543
8	1.519	1.190	2.031
9	0.784	0.403	1.310
10	0.682	0.153	1.005
11	0.466	0.230	0.672
12	0.319	0.129	0.414
13	0.311	0.114	0.429
14	0.255	0.124	0.340
15	0.210	0.089	0.250
16	0.312	0.077	0.477
17	0.374	0.119	0.496
18	0.276	0.095	0.348
19	0.411	0.155	0.602
20	0.233	0.105	0.335
21	0.246	0.075	0.330
22	0.239	0.054	0.312
23	0.314	0.103	0.457
D-CK	2.267	2.049	2.240
2H-CK	0.184	0.186	0.206
No. positive	23	5	23
Av. positive value	0.454	0.490	0.616

^z Tested antigens are the diseased passiflora leaves only infected by East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed viral protein.

^y The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) were considered undetectable by indirect ELISA.

^x Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

EAPV-IBCP 多元抗體檢測，則僅檢出 5 個樣品，正反應樣品讀值之平均值為 0.490；(2) 對檢測 EAPV-IB 罹病組織而言 (表 4)，受測的 27 個樣品均能以 EAPV-IBCP 多元抗體或 Anti-EAPV-

mix 檢出，而正反應樣品的 ELISA 讀值平均值，則以 Anti-EAPVmix 檢出者為 1.604，高於單獨以 EAPV-IBCP 抗體檢出的 1.333；若以 EAPV-AOCP 多元抗體檢測，則僅檢出 26 個樣

表 4. 以 indirect ELISA 法和不同抗體檢測單獨罹染 East Asian Passiflora virus (EAPV)-IB 之百香果罹病組織。

Table 4. Detection of the East Asian Passiflora virus (EAPV)-IB infected passiflora tissues by different polyclonal antibodies in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

EAPV-IB isolate ^z	ELISA reading (A_{405nm}) of samples detected with ^y		
	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPVmix ^x
1	1.975	1.385	2.181
2	0.806	0.450	1.067
3	0.806	0.453	1.223
4	0.461	0.282	0.785
5	0.903	0.558	1.350
6	1.383	0.897	1.740
7	2.245	1.397	2.398
8	2.075	1.157	2.216
9	1.233	1.004	1.404
10	2.163	1.636	2.210
11	1.513	0.867	1.742
12	0.508	0.495	1.058
13	1.758	1.780	1.585
14	1.190	0.985	1.802
15	1.597	0.967	2.174
16	1.276	0.639	1.443
17	1.838	1.210	1.431
18	0.852	0.667	1.066
19	0.888	0.751	1.376
20	1.023	0.952	1.617
21	0.853	0.712	1.514
22	1.440	0.999	2.094
23	1.466	0.850	1.658
24	2.150	1.992	2.398
25	2.052	1.232	1.751
26	1.550	0.813	1.726
27	0.168	0.168	0.286
D-CK	2.317	2.992	2.386
2H-CK	0.145	0.168	0.206
No. positive	27	26	27
Av. positive value	1.333	0.967	1.604

^z Tested antigens are the diseased passiflora leaves only infected by East Asian Passiflora virus (EAPV)-IB. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed viral protein.

^y The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) were considered undetectable by indirect ELISA.

^x Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

品，讀值平均值為 0.967；(3) 對檢測 TeMV 罹病組織而言 (表 5)，受測的 30 個樣品中 (包含 21 個台灣分離株和 9 個泰國分離株)，均能以 TeMV-CP 多元抗體或抗體混合液 Anti-EAPV-mix 檢出，其正反應樣品的 ELISA 讀值平均值，則以 TeMV 多元抗體檢出者的 1.452，高於以 Anti-EAPVmix 檢出之 0.628；若單獨以 EAPV-AOCP 或 EAPV-IBCP 多元抗體做檢測，則檢出之樣品數分別為 19 和 16 個，無法全數檢出 TeMV。

本試驗結果進一步顯示，對田間罹染病毒的百香果罹病組織而言，在放大受檢樣品數時，以抗體混合液 Anti-EAPVmix 均可檢出 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV，且對 EAPV-AO 和 EAPV-IB 的檢測，有優於單獨以個別抗體檢測的效果；此外，本抗體混合液均可檢出台灣和泰國的百香果 TeMV 分離株，有達到以非同源抗體進行替代性檢測不同類病毒的效果。

以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體混合液檢測百香果罹病枝條之病毒分布

本研究探討以抗體混合液 Anti-EAPVmix 檢測百香果枝條上、中、下三區段內之葉片和莖部採樣對檢出病毒的影響，檢測罹染 EAPV-AO 或 EAPV-IB 共 51 個枝條的結果顯示：無論是取樣哪個區段的受測組織，以採取葉片組織做檢測，所獲得的 ELISA 正反應讀值平均 (A_{405nm}) (約 1.159–1.421) 均高於各區段的莖部組織檢測值 (約 0.727–0.907)，尤其以上段區域內的葉片 (含新葉) 之病毒檢出率最高，達 92.1%；其他各部位的病毒檢出率介於 68.6–78.4% (表 6)。

以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體混合液檢測不同田區百香果罹病樣品之效果

由上述已建立的 EAPV-AOCP/EAPV-IB-CP 抗體混合檢測法，以及最適當的枝條上段葉片取樣部位為基礎，以 indirect ELISA 法檢測進行田間不同百香果田區的病毒發生調查。由埔里大坪頂 12 個田區和后里 1 個田區

共 387 個受檢樣品，結果顯示以抗體混合液 Anti-EAPVmix 可檢出 321 個樣品罹染病毒，均高於單獨以 EAPV-AOCP 抗體檢出數 302 個和以 EAPV-IBCP 抗體檢出數 274 個，顯示抗體混合法可檢出更多罹染病毒的樣品數 (表 7)，對田間百香果病毒發生調查有提升檢出病毒準確度的效果。

討論

本研究為台灣首度完成以細菌生合成系統誘導表現百香果病毒 EAPV-AOCP 和 EAPV-IB-CP 做為抗原，製備出具有廣效檢測不同馬鈴薯 Y 屬病毒之多元抗體，並印證以此兩種多元抗體混合使用可提升對同源病毒及其他百香果 *Potyvirus* 病毒的檢測效率，除了可簡化免疫檢測法的操作及節省成本外，對於田間百香果病毒發生調查鑑定也可做為替代性的多元抗體使用，尤其用於廣效檢測 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 而提升檢出病毒的準確度；進一步以 indirect ELISA 法探討 EAPV 病毒在百香果枝條不同部位為不均勻分布，並掌握可提升檢出病毒之取樣部位，整體技術可提升以免疫檢測百香果 potyviruses 的效益。

EAPV-AO 和 EAPV-IB 為亞洲常見的百香果病毒 (Iwai *et al.* 2006b; Chang *et al.* 2017; Chong *et al.* 2018)；在台灣，引起嚴重型木質化病徵主要為 EAPV 的 AO 系統 (Chong *et al.* 2018)，影響百香果品質甚鉅，因此在百香果種苗產業上被高度重視；此 2 種病毒，在台灣於 2016 年行政院動植物防疫檢疫局公告實施為『百香果種苗病害驗證作業須知』之標的病毒。近年來 TeMV 在泰國、中國大陸和台灣的百香果田間發生，也會引起百香果木質化病徵 (Lixue *et al.* 2017; Yang *et al.* 2018; Lee *et al.* 2020; Xie *et al.* 2020)，筆者等人近年來調查 TeMV 在台灣百香果產地的檢出率大約在 32.1–35.8%，顯示 TeMV 已普遍存在台灣田間 (Lee *et al.* 2020)。本研究為提升以免疫檢測法對 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 等百香果病毒之檢出效率，除以往已完成 TeMV 多元抗體製備與免疫檢測應用外 (Lee *et al.* 2020)，

表 5. 以 indirect ELISA 法和不同抗體檢測單獨罹染 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 之百香果罹病組織。

Table 5. Detection of the *Telosma mosaic virus* (TeMV)-infected passiflora tissues by different polyclonal antibodies in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

TeMV isolate ^z	ELISA reading (A_{405nm}) of samples detected with ^y			
	Anti-TeVCP	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPVmix ^x
Tw 1	2.037	0.348	0.300	0.634
Tw 2	1.186	0.214	0.236	0.428
Tw 3	1.023	0.090	0.112	0.251
Tw 4	1.511	0.539	0.249	0.898
Tw 5	1.407	0.153	0.179	0.299
Tw 6	1.920	0.437	0.343	0.647
Tw 7	1.746	0.310	0.135	0.461
Tw 8	1.279	0.405	0.459	0.589
Tw 9	1.618	0.216	0.110	0.430
Tw 10	1.647	0.358	0.178	0.682
Tw 11	0.992	0.203	0.115	0.370
Tw 12	2.060	0.479	0.455	0.738
Tw 13	1.672	0.256	0.247	0.390
Tw 14	1.025	0.123	0.142	0.310
Tw 15	1.382	0.215	0.136	0.415
Tw 16	1.530	0.202	0.105	0.607
Tw 17	1.351	0.158	0.128	0.299
Tw 18	1.683	0.398	0.184	0.732
Tw 19	1.473	0.652	0.246	1.035
Tw 20	2.240	0.824	0.883	1.223
Tw 21	1.789	1.084	0.722	1.507
TL1	1.334	0.643	0.398	1.019
TL3	1.062	0.237	0.421	0.681
TL5	1.408	0.367	0.165	0.695
TL6	0.894	0.329	0.311	0.694
TL7	1.790	0.651	0.380	1.055
TL8	1.666	0.446	0.579	0.880
TL9	1.763	0.729	0.411	0.788
TL14	0.599	0.114	0.072	0.304
TL15	0.461	0.073	0.076	0.392
D-CK	2.060	2.163	2.150	2.031
2H-CK	0.182	0.214	0.172	0.180
No. positive	30	19	16	30
Av. positive value	1.452	0.500	0.415	0.628

^z Tested antigens are the diseased passiflora leaves only infected by *Telosma mosaic virus* (TeMV), sample Tw 1–21 are Taiwan isolates and TL is Thailand isolates. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed viral protein.

^y The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered undetectable. The bacterial-expressed viral proteins are used as positive controls (D-CK).

^x Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

表 6. 應用多元抗體混合法於 indirect ELISA 檢測百香果枝條不同部位之病毒分布。

Table 6. Detection of the viruses on different portions of passiflora branches by the mixture of polyclonal antibodies against East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Sample ^z	ELISA reading (A_{405nm}) of different portions on shoot ^y					
	Stem			Leaf		
	Upper	Middle	Lower	Upper	Middle	Lower
1	0.955	1.455	0.969	1.436	1.660	2.654
2	0.748	2.145	0.033	1.055	2.407	2.500
3	0.338	0.120	0.094	1.321	1.851	2.153
4	0.222	0.045	0.083	2.515	2.066	1.773
5	0.223	1.268	1.916	1.595	2.129	2.401
6	1.316	1.057	0.159	1.767	2.361	2.635
7	2.235	0.945	0.634	1.625	1.537	2.062
8	0.727	1.818	1.157	1.676	1.812	2.083
9	1.525	2.040	0.884	2.512	0.214	2.465
10	1.252	1.061	1.415	1.906	1.890	1.028
11	1.743	2.634	0.588	2.047	0.070	0.579
12	1.626	0.089	0.389	2.267	2.360	2.362
13	0.044	0.037	0.122	0.365	0.114	1.743
14	0.548	1.210	0.494	1.149	2.336	1.810
15	1.286	1.717	1.731	2.302	1.749	2.309
16	0.038	0.059	0.624	0.042	1.209	1.093
17	0.156	0.273	0.614	1.081	1.777	1.519
18	0.951	0.218	0.170	2.030	1.518	1.872
19	2.157	1.956	1.760	1.977	0.380	0.414
20	0.427	0.930	0.121	1.306	0.144	1.295
21	0.808	0.750	0.785	0.807	0.040	0.317
22	0.701	1.112	0.948	1.545	0.075	0.399
23	1.146	1.171	0.770	1.206	0.285	0.136
24	0.572	0.507	0.374	0.330	0.219	0.279
25	1.383	0.635	1.210	0.306	0.203	0.116
26	0.585	0.094	0.123	0.246	0.763	0.217
27	0.427	0.521	0.196	0.762	0.934	1.071
28	0.400	0.244	0.093	1.143	1.539	1.264
29	0.139	0.103	0.081	0.941	1.393	1.194
30	0.435	0.493	0.817	0.689	0.064	0.065
31	0.602	0.265	0.258	1.068	0.876	1.494
32	0.474	0.481	0.388	0.971	0.214	0.127
33	0.041	0.149	0.105	0.357	0.084	0.073
34	1.310	0.367	0.157	1.416	0.811	0.078
35	0.071	0.850	0.237	0.141	0.594	0.161
36	0.465	0.168	0.197	0.592	0.074	0.046

表 6. 應用多元抗體混合法於 indirect ELISA 檢測百香果枝條不同部位之病毒分布。(續)

Table 6. Detection of the viruses on different portions of passiflora branches by the mixture of polyclonal antibodies against East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (continued)

Sample ^z	ELISA reading (A_{405nm}) of different portions on shoot ^y					
	Stem			Leaf		
	Upper	Middle	Lower	Upper	Middle	Lower
37	1.426	0.655	0.305	0.273	1.265	0.116
38	0.090	1.105	0.209	0.336	0.599	0.145
39	0.453	0.149	0.166	0.579	0.074	0.067
40	1.386	0.611	0.218	1.229	0.260	0.071
41	0.889	0.268	0.380	1.167	1.286	0.122
42	0.232	0.345	1.081	1.097	0.855	1.628
43	0.206	0.217	0.652	0.495	0.983	1.206
44	1.112	0.770	0.499	0.658	0.040	0.040
45	0.131	0.049	1.139	0.481	0.047	0.583
46	0.263	0.503	0.206	1.189	0.628	1.068
47	0.330	0.130	0.192	0.788	1.414	1.088
48	0.676	1.124	0.438	1.121	0.045	0.038
49	0.025	0.028	0.609	0.029	0.158	0.931
50	0.087	0.426	0.216	0.166	0.990	0.252
51	0.129	0.346	0.530	0.741	0.353	0.057
No. positive	40	38	35	47	38	35
% positive	78.4	74.5	68.6	92.1	74.5	68.6
Av. positive value	0.864	0.907	0.727	1.159	1.203	1.421

^z Tested samples are the diseased passiflora leaves infected by East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO, EAPV-IB or telosma mosaic virus (TeMV).

^y The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered undetectable. The bacterial-expressed viral proteins are used as positive controls (D-CK). Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP was used for reaction.

於本研究中開發以細菌生合成系統誘導表現 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 做為多元抗體製備的抗原來源。由本研究結果顯示所獲得對應 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 的多元抗體，除了可有效檢測個別的同源病毒抗原外，也具有對其他百香果和花卉等 potyviruses (表 1) 的廣效性檢出效果。利用表現載體之細菌生合成系統獲得病毒 CP 抗原，可突破病毒罹病檢體缺乏或病毒純化不易的瓶頸，而成功製備出可有效檢測特定病毒之多元抗體與正對照品，進而掌握對特定病毒之檢測鑑定能力，此策略以往已見諸對台灣尚未發生之蘭花病毒 *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) (Chen & Chiang

2017) 及百香果 TeMV (Lee *et al.* 2020) 等病毒之檢測試劑製備，藉此技術可實用於開發不同來源病毒的檢測試劑，達到強化自主檢疫監測重要作物病毒的能力。

病毒多元抗體使用於免疫反應中容易產生非專一性的結果 (Shukla *et al.* 1988; Jordan & Hammond 1991)，乃因抗原免疫過程中，因為所對應同一分子的不同抗原決定基 (antigenic determinants) 而產生 (Souiri *et al.* 2014)；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反應 (Shepard *et al.* 1974; Shukla *et al.* 1989)，多元抗體因此可針對不同病毒達到廣效性檢測的效果。廣

表 7. 以 indirect ELISA 法和不同抗體檢測田間百香果罹染病毒之檢出數。

Table 7. Field survey by detection of the passiflora viruses with the different polyclonal antibodies in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Field ^z	No. of samples positively detected by indirect ELISA ^y			
	Tested no. samples	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPVmix
Puli 1	40	30	31	36
Puli 2	15	12	10	12
Puli 3	30	28	9	28
Puli 4	5	5	5	5
Puli 5	32	9	6	11
Puli 6	50	43	42	47
Puli 7	27	23	22	23
Puli 8	39	31	30	33
Puli 9	22	11	11	11
Puli 10	29	28	27	28
Puli 11	23	21	22	22
Puli 12	28	19	18	20
Houli	47	42	41	45
Total no.	387	302	274	321

^z Tested samples were collected from different passiflora fields located in Puli, Nantou County and Houli, Taichung City, Taiwan.

^y No. of the virus positively detected samples was conducted by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) by the polyclonal antibody against East Asian Passiflora virus (EAPV)-AOCP, EAPV-IBCP and the mixture of EAPV-AOCP/EAPV-IBCP (Anti-EAPVmix) at equal ratio, respectively.

效性免疫檢測對檢測植物病毒而言，具有降低成本與提升對不同病毒（或未知病毒）同時檢出效率的優點，在國內外的研究上目前大多以 2 種或以上的病毒 CP 基因重組後，同時構築於表現載體上，再利用細菌表現融合性重組蛋白的方式以獲得多重抗原來源，以製備可廣效性檢測不同類病毒之抗體，相關成功的研究包括有可同時檢測瓜類或茄科病毒 cucumber mosaic virus (CMV)、papaya ringspot virus (PRSV) 和 groundnut bud necrosis virus (GBNV) (Kapoor *et al.* 2014a)；可同時檢測馬鈴薯病毒 potato virus Y (PVY) 和 PVX (Kapoor *et al.* 2014b) 的多元抗體等。

本研究以單獨表現 EAPV-AOCP 或 EAPV-IBCP 的融合性蛋白做為抗原而個別製備出之對應抗體，本身即具有可同時檢測多種 potyviruses 的效果 (表 1、圖 2)；在百香果病毒方面，包括可檢出常見的 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV，更可擴及毛西番蓮的 EAPV-AO 分離株、泰國 TeMV 分離株和越南的百香果新

興病毒 PVNV (表 1)，具有高度檢出對不同來源的同屬病毒之潛力；而若改以抗體混合液 Anti-EAPVmix 進行檢測，同樣具有廣效性檢出 19 種受測 potyviruses 樣品的效果，尤其於 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 罹病組織的稀釋倍數達 5⁻⁶ 時，仍均可以抗體混合液 Anti-EAPVmix 檢出 (表 2)；此外，若擴展到田間大量罹病樣品的檢測時，對病毒的檢出率以抗體混合法均有優於以單一病毒抗體做檢測的效果 (表 3、表 4、表 7)，顯見本研究所使用的 EAPV-AOCP/EAPV-IBCP 抗體混合檢測方式，具有提升對百香果不同 potyviruses 廣效性檢測的成效，更可節省檢測耗材使用與成本。

病毒感染作物後，在植物體各部位組織內通常為不均勻分布 (Chen *et al.* 1999; Chen *et al.* 2013)，因此以免疫檢測法檢測病毒時，須配合適當的取樣部位以提升檢出準確度，例如筆者以往已報告由百合種球或植株根系取樣檢測可穩定檢出 *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV) 病毒且獲得高檢出率 (Chen *et al.* 2013)。本研

究以 EAPV-AOCP/EAPV-IBCP 多元抗體混合法檢測田間罹染有 EAPV-AO 或 EAPV-IB 的百香果枝條，依其不同部位的葉片或莖部組織檢測病毒結果，可於近新芽區段的完全展開葉片檢出更高比例的病毒，顯示此區段上的葉片更適合用於做為病毒檢測的取樣部位；此對於建立百香果病毒檢測準確度上，除可應用抗體混合法同時檢測可能的百香果不同 potyviruses 時，簡化檢測用抗體種類和節省成本外，更可採樣適當部位達到以免疫檢測提升病毒檢出率的成效。

本研究發現以 EAPV-AOCP/EAPV-IBCP 抗體混合方式可達到檢出台灣和泰國 TeMV 百香果分離株的效果 (表 1、表 5)，其重要意義在於泰國 TeMV 分離株與台灣分離株在 CP 胺基酸的相同度比較分析中，具有不同地理位置之類緣差異 (Lee *et al.* 2020)，仍可以本研究之免疫檢測方法檢出；此外，也可檢出越南新興的百香果病毒 PVNV (Chong 2018) (表 1)。本研究所應用之抗體混合法可一次檢出潛在的 EAPV-AO、EAPV-IB、TeMV 和 PVNV 等不同百香果 potyviruses (表 1)，可提升對田間監測不同 potyviruses 發生概況的效益，尤其對大量調查與篩檢不同地理位置之同類病毒具有相當高之應用潛力。而對於亞洲不同地理位置上之百香果 EAPV-AO、EAPV-IB、TeMV 或其他種 potyviruses 檢測，未來若能收集更多的國際百香果 potyviruses 進行檢測試驗，則可進一步對於本研究所研製的百香果病毒抗體之檢測廣度有更明確的成效評估。

誌謝

本試驗承本組病毒研究室助理黃美容小姐協助多元抗體檢測試驗；農業試驗所退休研究人員張清安博士保存於本實驗室之百香果 PCV (同 CABMV) 材料；行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 106 年百香果重要病毒檢測試劑套組開發應用計畫 [106 農科 -9.4.1-檢-B3 (1)] 和行政院農業委員會 107 年度農業研發成果跨域整合創新加值與產業化應用計畫 (MOST 107-3111-Y-067E-016) 之經費補助，謹此一併致謝。

引用文獻

- Baranwal, V. K., R. Kapoor, S. Kumar, and N. Srivastava. 2020. Recent advances of virus diagnostics in horticultural crops. p.27–37. *in*: Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies. (Awasthi, L. P., ed.) Academic Press. London, UK. 821 pp. doi:10.1016/B978-0-12-818654-1.00002-5
- Chang, C. A. 1992. Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with passionfruit woodiness virus. *Phytopathology* 82:1358–1363. doi:10.1094/Phyto-82-1358
- 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. doi:10.1094/Phyto-78-1266
- Chang, C. A. and H. H. Lin. 1989. Passionfruit crinkle virus, a new potyvirus isolated from passionfruit in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 31:409–410.
- Chang, C. A., L. C. Huang, Y. C. Chen, Y. Y. Lin, H. C. Lu, and Y. D. Lin. 2017. A review of the research and control of passionfruit virus diseases in Taiwan. *J. Plant Med.* 59(3):1–12. doi:10.6716/JPM.201709_59(3).0001
- Chen, C. C., C. A. Chang, and T. Dai. 1999. Variable distribution patterns of bean yellow mosaic potyvirus and cucumber mosaic cucumoviruses in gladiolus plant and their influence on virus detection. *Plant Pathol. Bull.* 8:117–120. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.199909_8(3).0005
- 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.
- Chen, C. C., Y. L. Jhang, B. Y. Lin, F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2013. Serological reagent preparation and improvement of serological method for the detection of *Plantago asiatica* mosaic virus in lily. *J. Taiwan Agric. Res.* 62:268–279. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2013.06203.07
- 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) doi:10.6156/JTAR/2017.06603.04
- Chen, C. C., F. L. Chiang, and C. H. Huang. 2018a. Molecular and serological identification of *Gloriosa stripe mosaic virus* on Christmas bells (*Sandersonia*

- aurantiaca* Hook). J. Taiwan Agric. Res. 67:229–246. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201809_67(3).0001
- Chen, C. C., F. L. Chiang, C. M. Hsu, and M. R. Huang. 2019. Development and application of nucleic acid detection technology for *East Asian Passiflora virus* and *Telosma mosaic virus*. J. Plant Med. 61(2–3):73. (in Chinese)
- Chen, S., N. Yu, S. Yang, B. Zhong, and H. Lan. 2018b. Identification of *Telosma mosaic virus* infection in *Passiflora edulis* and its impact on phytochemical contents. Virol. J. 15:168. doi:10.1186/s12985-018-1084-6
- Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, C. H. Chiang, and C. A. Chang. 2014. First report of *Euphorbia leaf curl virus* and *Papaya leaf curl Guangdong virus* on passion fruit in Taiwan. Plant Dis. 98:1746. doi:10.1094/PDIS-05-13-0554-PDN
- Chiemsombat, P., S. Prammanee, and N. Pipattanawong. 2014. Occurrence of *Telosma mosaic virus* causing passion fruit severe mosaic disease in Thailand and immunostrip test for rapid virus detection. Crop Prot. 63:41–47. doi:10.1016/j.cropro.2014.04.023
- Chong, Y. H. 2018. Characterization of passionfruit-infecting viruses in Taiwan and Vietnam and generation of cross-protection effective mild strains of *East Asian Passiflora virus*. Doctoral Dissertation. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 163 pp.
- Chong, Y. H., Y. H. Cheng, H. W. Cheng, Y. C. Huang, and S. D. Yeh. 2018. The virus causing passionfruit woodiness disease in Taiwan is reclassified as *East Asian Passiflora virus*. J. Gen. Plant Pathol. 84:208–220. doi:10.1007/s10327-018-0777-4
- Clark, M. F. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. Ann. Rev. Phytopathol. 19:83–106. doi:10.1146/annurev.py.19.090181.000503
- 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
- Coutts, B. A., M. A. Kehoe, C. G. Webster, S. J. Wylie, and R. A. C. Jones. 2011. Indigenous and introduced potyviruses of legumes and *Passiflora* spp. from Australia: Biological properties and comparison of coat protein nucleotide sequences. Arch Virol. 156:1757–1774. doi:10.1007/s00705-011-1046-4
- Do, D. H., Y. H. Chong, V. C. Ha, H. W. Cheng, Y. K. Chen, T. N. L. Bui, T. B. N. Nguyen, and S. D. Yeh. 2021. Characterization and detection of passionfruit mottle virus and two other potyviruses causing passionfruit woodiness disease in Vietnam. Phytopathology 111:1675–1685. doi:10.1094/PHTO-10-20-0481-R
- Fischer, I. H. and J. A. M. Rezende. 2008. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). Pest Technol. 2(1–2):1–19.
- Fukumoto, T., M. Nakamura, M. Rikitake, and H. Iwai. 2012. Molecular characterization and specific detection of two genetically distinguishable strains of *East Asian Passiflora virus* (EAPV) and their distribution in southern Japan. Virus Genes 44:141–148. doi:10.1007/s11262-011-0676-7
- Ha, C., S. Coombs, P. A. Revill, R. M. Harding, M. Vu, and J. L. Dale. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Arch. Virol. 153:25–36. doi:10.1007/s00705-007-1053-7
- Iwai, H., R. Terahara, Y. Yamashita, S. Ueda, and M. Nakamura. 2006a. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-Shima strain of *East Asian Passiflora potyvirus*. Arch. Virol. 151:1457–1460. doi:10.1007/s00705-006-0779-y
- Iwai, H., Y. Yamashita, N. Nishi, and M. Nakamura. 2006b. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species *East Asian Passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. Arch. Virol. 151:811–818. doi:10.1007/s00705-005-0659-x
- 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. doi:10.1099/0022-1317-72-1-25
- Kapoor, R., B. Mandal, P. K. Paul, P. Chigurupati, and R. K. Jain. 2014a. Production of cocktail of polyclonal antibodies using bacterial expressed recombinant protein for multiple virus detection. J. Virol. Methods 196:7–14. doi:10.1016/j.jviromet.2013.09.016
- Kapoor, R., B. Mandal, P. K. Paul, and R. K. Jain. 2014b. Simultaneous detection of potato viruses Y and X by DAC-ELISA using polyclonal antibodies raised against fused coat proteins expressed in *Escherichia coli*. J. Plant Biochem. Biotechnol. 23:332–335. doi:10.1007/s13562-013-0251-5
- Kil, E. J., H. Seo, H. S. Byun, S. S. Suh, T. K. Lee, K. Y. Lee, J. H. Lee, J. K. Kim, S. J. Ko, H. S. Choi, C. S. Kim, and S. Lee. 2016. First report of *Euphorbia leaf curl virus* in passion fruits in South Korea and its natural occurrence in papaya. Plant Dis. 100:865. doi:10.1094/PDIS-08-15-0854-PDN

- Koenig, R. and H. L. Paul. 1982. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *J. Virol. Methods* 5:113–125. doi:10.1016/0166-0934(82)90088-X
- Lee, W. L., C. Thanarut, C. C. Hsu, G. C. Lee, F. L. Chiang, and C. C. Chen. 2020. Molecular characterization of the *Telosma mosaic virus* passionfruit isolates and the development and application of its wide-spectrum molecular detection techniques. *J. Taiwan Agric. Res.* 69:46–64. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.202003_69(1).0004
- 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. doi:10.1007/s007050050476
- Liberato, J. R. and F. M. Zerbini. n.d. Diseases of Passionfruit (*Passiflora* spp.). The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Passionfruit.aspx> (visit on 08/25/2021)
- Lixue, X., X. Y. Zhang, S. Zheng, L. J. Zhang, and T. Li. 2017. Molecular identification and specific detection of *Telosma mosaic virus* infecting passion fruit. *Sci. Agric. Sin.* 50:4725–4734.
- Ma, X. Y., J. H. Cai, G. X. Li, B. X. Qin, and X. P. Zhou. 2004. Molecular characterization of a distinct *Begomovirus* infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. *J. Phytopathol.* 152:215–218. doi:10.1111/j.1439-0434.2004.00832.x
- Nakasato, K., S. Fujioka, Y. Sugawara, T. Ono, T. Nishio, and S. Tsuda. 2020. First detection of two potyviruses, uraria mosaic virus and passiflora mosaic virus Y, from passionfruit in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 86:401–404. doi:10.1007/s10327-020-00932-4
- Nascimento, A. V. S., E. N. Santana, A. S. K. Braz, P. F. Alfenas, G. Pio-Ribeiro, G. P. Andrade, M. G. de Carvalho, and F. M. Zerbini. 2006. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Arch. Virol.* 151:1797–1809. doi:10.1007/s00705-006-0755-6
- Noveriza, R., G. Suastika, S. H. Hidayat, and U. Kartosuwondo. 2012. Potyvirus associated with mosaic disease on patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] plants in Indonesia. *J. ISSAAS* 18(1):131–146.
- 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
- Parrella, G. and C. Lanave. 2009. Identification of a new pathotype of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) infecting blue passion flower and some evolutionary characteristics of BYMV. *Arch. Virol.* 154:1689–1694. doi:10.1007/s00705-009-0485-7
- 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. doi:10.1016/0042-6822(74)90081-6
- 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. doi:10.1099/0022-1317-69-7-1497
- Shukla, D. D., J. Jilka, M. Tosic, 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. doi:10.1099/0022-1317-70-1-13
- Song, Y. S. and K. H. Ryu. 2011. The complete genome sequence and genome structure of passion fruit mosaic virus. *Arch. Virol.* 156:1093–1095. doi:10.1007/s00705-011-0961-8
- 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.
- Spiegel, S., M. Zeidan, I. Sobolev, Y. Beckelman, V. Holdengreber, Y. Tam, M. Bar Joseph, Z. Lipsker, and A. Gera. 2007. The complete nucleotide sequence of *Passiflora latent virus* and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. *Arch. Virol.* 152:181–189. doi:10.1007/s00705-006-0833-9
- Tsai, Y. T. 2019. Isolation and identification of *Telosma mosaic virus* on passionfruit in Taiwan and development of its detection techniques. Master Thesis. International Master Program of Agriculture, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 94 pp.
- Wang, X., Y. Xie, and X. Zhou. 2004. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. *Virus Genes* 29:303–309. doi:10.1007/s11262-004-7432-1
- Wylie, S. J. and M. G. K. Jones. 2011. The complete genome sequence of a *Passion fruit woodiness virus* isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. *Arch. Virol.* 156:479–482. doi:10.1007/s00705-010-0845-3
- Xie, L., F. Gao, J. Shen, X. Zhang, S. Zheng, L. Zhang, and T. Li. 2020. Molecular characterization of two recombinant isolates of telosma mosaic virus infecting *Passiflora edulis* from Fujian Province in China.

PeerJ 8:e8576. doi:10.7717/peerj.8576

Yang, K., H. Yan, L. Song, P. Jin, W. Miao, and H. Cui. 2018. Analysis of the complete genome sequence of a potyvirus from passion fruit suggests its taxonomic classification as a member of a new species. *Arch. Virol.* 163:2583–2586. doi:10.1007/s00705-

018-3885-8

Yao, L. Z., X. O. Li, J. G. Wang, S. Y. Chen, and X. J. Wang. 2019. First report of *Telosma mosaic virus* infecting Emperor's Candlesticks (*Senna alata*) in China. *Plant Dis.* 103:594. doi:10.1094/PDIS-04-18-0706-PDN

Improvement of Wide-Spectrum Detection of Different Potyviruses Infecting Passion Fruit by the Mixture of Two Kinds of Polyclonal Antibodies Against East Asian *Passiflora* Virus

Chin-Chih Chen^{1,*}, Fen-Lang Chiang², Ying-Huey Cheng¹, and Jia-Yi Liao²

Abstract

Chen, C. C., F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and J. Y. Liao. 2022. Improvement of wide-spectrum detection of different potyviruses infecting passion fruit by the mixture of two kinds of polyclonal antibodies against east Asian *passiflora* virus. *J. Taiwan Agric. Res.* 71(2):101–121.

When the virus-infected passion fruits showed woodiness symptoms on fruits, the fruits were deformed and smaller resulting in a low juice rate, poor flavor and quality, which could cause a great impact on yield. Two East Asian *Passiflora* viruses (EAPV-AO and EAPV-IB) and *Telosma* mosaic virus (TeMV) are the three main potyviruses infecting passion fruits in Taiwan. In this study, the polyclonal antibodies against the coat proteins (CP) of EAPV-AO and EAPV-IB were respectively prepared from immunizing rabbits with the bacterial expressed viral CPs, revealing that both antibodies have a wide-spectrum response with 19 tested potyviruses. In indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA), the equivalent mixture of polyclonal antibodies against the CPs of EAPV-AO and EAPV-IB, denoted Anti-EAPVmix, could also be used to detect passionfruit isolates of TeMV from Taiwan and Thailand, and to improve the detection rate of EAPV-AO, EAPV-IB, and TeMV. The distribution of viruses on plant branches was detected by Anti-EAPVmix. The virus was detected at a high rate from the upper part near new leaves, which is recommended for sampling. Our result showed that the mixture of EAPV polyclonal antibodies can be used to detect not only the three major *passiflora* viruses in Taiwan but also other potyviruses to save the detection time and costs. The detection method can strengthen the field survey of *passiflora* viruses and the internal control of healthy seedlings.

Key words: *Passiflora* potyviruses, Polyclonal antibody, Antibody mixture, Wide-spectrum detection.

Received: August 17, 2021; Accepted: November 25, 2021.

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

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

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

