

草莓病毒 Strawberry Mild Yellow Edge Virus 鑑定與檢測試劑開發

陳金枝^{1,*} 蔡志濃² 陳美雅³ 廖家翌³ 江芬蘭³

摘要

陳金枝、蔡志濃、陳美雅、廖家翌、江芬蘭。2022。草莓病毒 strawberry mild yellow edge virus 鑑定與檢測試劑開發。台灣農業研究 71(3):199–207。

本研究由苗栗所採集的草莓 (*Haemanthus multiflorus* Martyn.) 葉片呈現褐色嵌紋病徵或無徵狀者，以自行設計可涵蓋草莓輕型黃邊病毒 (strawberry mild yellow edge virus; SMYEV) 全長度鞘蛋白基因之上下游引子對 (SMYCPu/SMYCPd)，利用反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 可增幅出預估約 838 bp 的核酸片段，經核苷酸定序分析後，確認係屬 SMYEV。本研究另設計 SMY273u/SMY273d 引子對，進行 RT-PCR 以作為田間草莓 SMYEV 的發生調查，於苗栗和台中霧峰等地檢出 SMYEV 之比率約為 10.6%。本研究另開發 SMYEV 多元抗體，將 SMYEV-CP 約 726 個核苷酸序列選殖於表現載體 pET28a (+) 上，轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 細胞內，誘導表現分子量約 26.7 kDa 之融合性蛋白，將此表現蛋白純化後做為抗原以製備進行多元抗體。於西方墨點法分析中，自製 (#206) 和市售 SMYEV 多元抗體 (Bioreba Ltd., Reinach, Switzerland) 均可與本研究表現之 SMYEV-CP 蛋白及市售 SMYEV 正對照品於預估分子量位置產生正反應，且自製之多元抗體可成功檢出草莓植株上之 SMYEV，而不會與草莓健康組織有非專一性反應；在間接式酵素連結免疫吸附分析法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 反應中，受測草莓樣品之 SMYEV 正反應讀值 (A_{405nm}) 均在 0.15–0.21 之間，而相同樣品以市售抗體檢出者之讀值也僅在 0.26–0.54 間，可能因為草莓內之病毒濃度或多元抗體之力價低所致。本研究乃首次於國內草莓檢出 SMYEV 病毒，且完成此病毒分離株之分子鑑定。所研發之 SMYEV 多元抗體及 RT-PCR 檢測法，除了建立對草莓 SYMEV 之自主檢測能力外，更可應用於提升草莓健康種苗之生產品質。

關鍵詞：草莓輕型黃邊病毒、分子鑑定、多元抗體、RT-PCR 檢測。

前言

草莓具高經濟性，可鮮食也可加工，用途甚廣，為全球性的產業；主要生產地區包括歐美、中國大陸、日本及韓國。草莓也是深受國內消費者喜愛之蔬果品。依據行政院農業委員會農業統計資料 (<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx>) 顯示 2020 年台灣的草莓栽培面積達 527 ha，年

產值超過 14.7 億元；主要栽培產區在苗栗縣 (占 88% 以上)，包括大湖、獅潭、公館、銅鑼、通霄、南庄及苗栗等鄉鎮市。國內的草莓於栽種季節容易受病蟲害的威脅而影響其生育與品質；病害主要包括有真菌、線蟲及病毒。國際間有紀錄的草莓病毒超過 25 種 (Martin & Tzanetakakis 2006; Torrico *et al.* 2018)，依病毒種類不同對草莓的影響各有差異，也常見有感染草莓後不呈現病徵者，但當與其他病毒複合

投稿日期：2021 年 10 月 16 日；接受日期：2022 年 2 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組研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。

感染時，則會加劇病徵表現而影響產能；此外，罹染病毒而不表現病徵者，其生長勢也會逐漸減弱 (Freeman & Mellor 1962; Bolton 1974; Dara 2015)。若以罹病植株作為繁殖用母本，則將導致幼苗出苗量變少。

草莓輕型黃邊病毒 (strawberry mild yellow edge virus; SMYEV) 為 *Potexvirus* 屬病毒成員，其自然寄主植物為草莓 (Hepp & Martin 1992; Jelkmann *et al.* 1992; Lamprecht & Jelkmann 1997)；病毒可藉由機械傷口感染、嫁接或匍匐莖帶病毒而傳播，或透過媒介昆蟲傳毒 (Krczal 1980)。國外報導 SMYEV 感染草莓造成葉緣黃化病徵，可使果實產量降低達 30%，感病品種會出現植株矮化及葉片扭曲等病徵 (Martin & Tzanetakis 2006; Tzanetakis & Martin 2013)；但也常有受 SMYEV 單獨感染的草莓不顯現病徵者 (Torricco *et al.* 2018)。

感染 SMYEV 的草莓尚未見諸於台灣正式文獻報告之前，本研究於 2017 年先行利用國外文獻所報導之 SMYEV 引子對 SMYEVdelta/SMYEVdetb (5'GTGTGCTCAATCCAGC-CAG3'/5'CATGGCACTCATTGGAGCTGGG3') (Thompson *et al.* 2003)，以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 檢測 2017 當年採集自苗栗之草莓樣品，首次篩檢到 4 個樣品可增幅出對應 SMYEV 之核酸分子片段，與預估約 271 bp 大小相近；進一步將此等 RT-PCR 增幅產物進行核苷酸定序，結果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) 上已登錄之 SMYEV (Accession no. AJ577358) 之核苷酸相同度均高達 97% 以上，初步推斷可能為相同之病毒。進一步就 SMYEV 鞘蛋白 (coat protein; CP) 的核酸分子進行選殖與定序，並同時建立對此病毒之 RT-PCR 檢測技術；此外，也製備針對 SMYEV 之多元抗體，以評估免疫檢測法對 SMYEV 之檢測效果。

材料與方法

SMYEV-CP 核酸分子鑑定

RT-PCR 法增幅 SMYEV-CP 核酸片段：

本研究設計可涵蓋全長度 SMYEV-CP 及其兩端共約 838 bp 核酸片段之引子對 SMYCPu/SMYCPd (5'CACAATCGCCCTGGTCAG-TA3'/5'GCACTCATTGGAGCTGGGTA3')，用於進行單步驟 RT-PCR 反應；參照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，進行草莓葉片組織樣品之全量核糖核酸 (total RNA) 萃取；RT-PCR 反應條件乃參照單步驟 RT-PCR 試劑組 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 之配方，於每一 25 μ L 反應液中分別加入 1 μ L 之全量 RNA、12.5 μ L 之 2 \times Reaction Mix、0.5 μ L 之 SuperScript III RT/Platinum Taq Mix、各 1 μ L 之 10 μ M 上游和下游引子和 9 μ L 之無菌水 [diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water]。所有試劑混合均勻後，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Göttingen, Germany) 中進行。設定反應程序如下：50 $^{\circ}$ C 下進行反轉錄 30 min、94 $^{\circ}$ C 變性 4 min；之後進行 26 個 PCR 循環反應：94 $^{\circ}$ C 下變性 1 min、50 $^{\circ}$ C 下黏合 1 min、72 $^{\circ}$ C 下聚合 1 min，最後一個循環之 72 $^{\circ}$ C 聚合反應延長為 7 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行判讀。

SMYEV-CP 核酸片段選殖、核苷酸和胺基酸序列分析：利用 SMYCPu/SMYCPd 引子對進行 RT-PCR 反應所增幅出之預估 838 bp 大小之核酸片段產物，選殖於 pGEM-T 載體上 (Easy Vector Systems; Promega, Madison, WI, USA)，以篩選出含有嵌入序列之選植株，並送交核酸定序公司 (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 基因資料庫上已登錄的 SMYEV-CP 序列進行核苷酸及胺基酸比對分析。

以 RT-PCR 法調查國內草莓 SMYEV 之發生

本研究以自行設計之引子對 SMY273u/

SMY273d (5'AATTGTCGCTGATCTGAACG3'/5'GGAGTGAAGTGGAGATTGGC3') 以 RT-PCR 法檢測台中霧峰區和苗栗兩地之草莓，以探討檢出有 SMYEV 之比率。樣本以呈現褐色嵌紋病徵或無症狀者之草莓葉片進行之，預估檢出之病毒核酸片段大小約 273 bp。

SMYEV-CP 蛋白表現及其多元抗體製備與檢測效果評估

本研究開發 SMYEV 多元抗體乃參考以往採用細菌表現蛋白以生產病毒鞘蛋白做為抗原之方式 (Chen *et al.* 2006)，首先設計引子對 SMYEVCP-PEu/SMYEVCP-PEd (5'GTGCACTTC-CATGGGAGATCAGC3'/5'AGCTAATCCTC-GAGACGTTAAGCG3') 用以增幅長度約 729 個核苷酸 (含轉譯終止碼 TAA) 之 SMYEV-CP 序列，並進一步選殖於表現載體 pET28a(+) 上 (Novagen, Inc., Madison, WI, USA)，轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 細胞內誘導融合性蛋白之生成，將預估分子量約 26.7 kDa 之細菌表現蛋白純化後，將其濃縮為 1 mg mL^{-1} 以做為抗原，並送交濁水溪生物科技有限公司 (台灣桃園市) 進行每週 1 次、連續 4 wk 的兔免疫注射以製備多元抗體 (#206)。

將本研究所自製 (#206) 和市售 SMYEV 多元抗體 (Bioreba Ltd, Reinach, Switzerland) 分別以間接式酵素連結免疫吸附分析法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 和西方墨點法 (western blotting) 進行草莓葉片樣品之測試比較。ELISA 步驟乃參照以往研究進行 (Clark & Adams 1977; Chen *et al.* 2016)，最終呈色反應加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (ρ -NPP) (Amresco, Solon, OH, USA)，反應 40 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，樣品吸收值大於 2 倍之健康葉片吸收值者視為正反應。

結果與討論

本研究以草莓葉片組織為材料 (圖 1)，利用 SMY273u/SMY273d 引子對進行 RT-PCR 反應，可檢出對應 SMYEV 預期大小 273 bp 之核酸片段 (圖 2B)，進一步利用可增幅病毒全長度鞘蛋白序列之引子對 (SMYCPu/SMYCPd) 進行 RT-PCR 反應，可成功獲得大小與預估值相符的 838 bp 核酸片段 (圖 2A)，



圖 1. 檢出有 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 之草莓罹病株葉片 (A) 呈現褐色嵌紋病徵者或 (B) 無徵狀者也有檢出病毒。

Fig. 1. Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) can be detected in strawberry plant leaves (A) showed brown mosaic or (B) asymptomatic symptom.

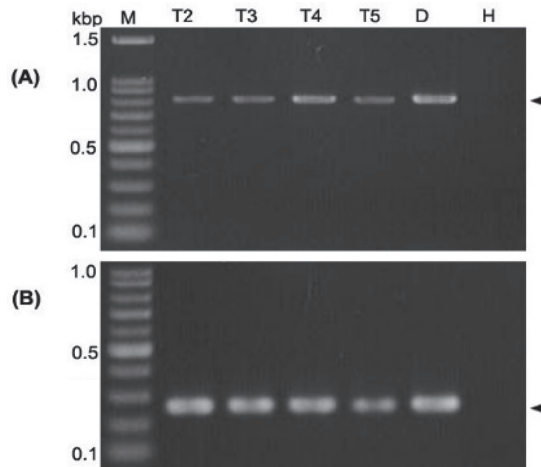


圖 2. 以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應檢測草莓 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 之電泳圖。行 M: 核酸分子量標幟; 行 T2、T3、T4 和 T5: 草莓罹病葉組織; 行 D: SMYEV 正對照品; 行 H: 健康草莓葉組織。以引子對 (A) SMYCPu/SMYCPd 或 (B) SMY273u/SMY273d 所增幅之核酸片段分別為 838 bp 和 273 bp (箭頭所指)。

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA products amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) in strawberries. Lane M: molecular marker; lanes T2, T3, T4 and T5: SMYEV-infected tissues; lane D: the positive control of SMYEV; lane H: the healthy control. The expected 838 bp and 273 bp of PCR products amplified by the primer pairs (A) SMYCPu/SMYCPd and (B) SMY273u/SMY273d (arrowed), respectively.

經選殖於 pGEM-T 質體上並進行核苷酸序列定序分析，結果顯示由不同草莓罹病葉片所獲得的 4 個選殖株 (T2、T3、T4、T5)，均具有 SMYEV 鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列之特性，包含全長度 CP 共 726 個核苷酸及對應 242 個胺基酸 (圖 3)，且 CP 胺基酸序列均與 GenBank 已登錄之 SMYEV (Accession no. AJ577347、AJ577358、EU284709) 有高達 99% 以上的相同度 (表 1、圖 3)，依據鞘蛋白核苷酸序列分子鑑定結果顯示為 SMYEV 病毒。

後續由苗栗和台中霧峰區採集草莓樣品共 292 個樣品，以 SMY273u/SMY273d 引子對進行 RT-PCR 檢測 (圖 2B)，可檢出與預期 SMYEV 病毒核酸片段約 273 bp 者共有 31 個樣品，因此 SMYEV 之檢出率約 10.6%。

本研究也另外利用細菌外源蛋白表現系統表現出 SMYEV-CP 抗原，於西方墨點法中可與市售 SMYEV 多元抗體 (Bioreba) 於融合性表現蛋白分子量預估約 26.7 kDa 之位置產生正反應條帶 (圖 4A-B)，且於 indirect ELISA 檢測中與市售抗體之反應值 (A_{405nm}) 也高達 3.8 (表 2)，顯示所表現的融合性蛋白質確實具有 SMYEV-CP 之抗原性。且後續以自製的 SMYEV-CP 多元抗體 (#206) 於西方墨點法中，均可與 SMYEV-CP 表現蛋白及市售 SMYEV 正對照品於預估分子量處產生正反應條帶 (圖 4C、圖 5)，也可檢出草莓上之 SMYEV (圖 5)，但市售 SMYEV 正對照品可能因病毒濃度低而導致於西方墨點法中與自製和市售抗體的呈色反應不明顯 (圖 5)。於 indirect ELISA 檢測中，自製之 SMYEV 多元抗體可與市售 SMYEV 對照樣品產生正反應 (表 2)，且不與草莓健康組織產生非專一性反應 (圖 5)，顯示本自製多元抗體有預期之免疫檢測成效，尤其對其他薔薇科植物 (包括梅、李和櫻桃) 之健康葉片組織也不會產生非專一性反應 (結果未出示)，而且本自製抗體與受測植物之健康組織反應之鑑別度上，有優於市售 SMYEV 多元抗體的效果。此外，無論在 indirect ELISA 或西方墨點法中，本研究以細菌表現之 SMYEV 鞘蛋白做為反應用正對照品時，無論是與自製或市售之 SMYEV 多元抗體反應，均可獲得比市售 SMYEV 正對照品反應更為明顯的結果 (表 2、圖 5)，更適合做為 SMYEV 免疫檢測用之正對照品。

自製之 SMYEV-CP 多元抗體可應用於 indirect ELISA 及西方墨點法來檢測 SMYEV；然而本研究結果顯示受測的 SMYEV 樣品，以自製之多元抗體檢測時，其 indirect ELISA 讀值 (A_{405nm}) 之正反應值約在 0.15–0.21 之間，而相同樣品由市售抗體檢出之正反應讀值也僅在 0.26–0.54 間 (表 2)；對於健康草莓的樣品，使用市售抗體檢測所得之讀值與自製抗體相比有偏高情形 (0.24 vs 0.14) (表 2)。在西方墨點法檢測中，將已由 RT-PCR 法檢測出有罹染 SMYEV 之草莓組織樣品，與自製和市售抗體產生之反應條帶並不強烈 (圖 5)，甚至有無法

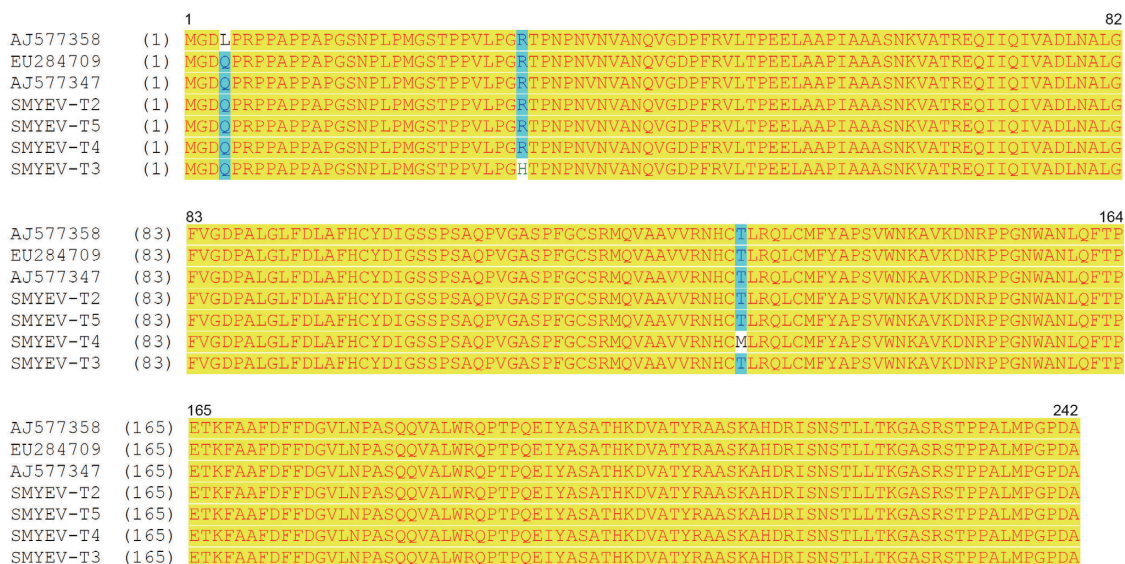


圖 3. 不同草莓 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 分離株之鞘蛋白胺基酸序列比對。

Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences of different strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) isolates. SMYEV-T2, T3, T4 and T5 were identified in this study. Three SMYEV isolates (with accession no.) available in GenBank were used for comparison.

表 1. 草莓 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 分離株與登錄於 GenBank 之相同病毒鞘蛋白基因序列表比對。

Table 1. Percent identities of the nucleotides and deduced amino acid sequences of the coat protein (CP) gene of strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) isolates to SMYEV available in GenBank.

SMYEV isolates	% identity of CP ^a	
	CP-nt	CP-aa
SMYEV-T2	100.0	100.0
SMYEV-T3	99.2	99.2
SMYEV-T4	99.6	99.2
SMYEV-T5	99.9	99.6
AJ577358	98.5	99.2
EU284709	98.5	99.6
AJ577347	97.9	99.6

^a Sequence analysis was conducted by using Vector NTI Suite program (InforMax, Inc., Wisconsin, USA).

檢出之現象 (圖 5B)。由上述 2 種免疫檢測法評估結果，推測可能因草莓罹病樣品內的病毒濃度低，或是抗體力價太低所致。因此，整體而言 SMYEV 以多元抗體進行免疫檢測較容易產生結果不明確的現象。因病毒濃度低導致檢

測不穩定之現象，也有見諸於國外的草莓病毒檢測報告中 (Conci *et al.* 2017; Fránová *et al.* 2019)。

因此，對草莓 SMYEV 的檢測鑑定上仍以核酸檢測法較為明確，尤其現今國際間已發表之草莓病毒檢測大多以核酸檢測法為之 (Posthuma *et al.* 2002; Thompson *et al.* 2003; Martin & Tzanetakis 2006; Ragab *et al.* 2009; Tzanetakis & Martin 2013)，加上草莓已有其他真菌病原已研發出核酸檢測法 (Lacourt *et al.* 1996)，未來草莓病原檢測將可以核酸檢測法為基礎，發展成同時檢測多種不同病原之組合。本研究設計之 SMYCPu/SMYCPd 引子對可應用於 RT-PCR 檢測時增幅出包含全長度 SMYEV-CP 及其兩端共 838 bp 之核酸片段 (圖 2A)，此可做為 SMYEV 分離株增幅和選殖定序之用，以提供分子鑑定與分類之需。而 SMY273u/SMY273d 引子對進行 RT-PCR，可用以增幅 SMYEV-CP 區域內約 273 bp 之核酸片段 (圖 2B)，作為田間草莓 SMYEV 之調查鑑定。

由上述 SMYEV 鞘蛋白核酸分子特性、RT-PCR 檢測及病毒多元抗體反應之結果，均

表 2. 利用細菌表現之 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 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分析法檢測草莓罹病株之效果。

Table 2. Detection efficiency of the polyclonal antibody prepared from the bacterial-expressed fusion coat protein of strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA).

Samples ²	ELISA reading (A_{405nm}) ³	
	Ab-SMYEV#206	Ab-SMYEV-Bioreba
T2	0.189	0.526
T3	0.157	0.359
T4	0.145	0.441
T5	0.212	0.544
T72	0.119	0.226
T74	0.125	0.179
T76	0.150	0.264
WF1	0.178	0.264
WF2	0.157	0.231
WF3	0.174	0.236
WF4	0.162	0.207
WF5	0.184	0.265
WF6	0.067	0.183
WF7	0.111	0.295
D-CK	0.525	0.874
D-BEP	3.572	3.808
2H-CK	0.140	0.240

² Tested samples are preserved diseased strawberry materials in the laboratory.

³ The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with ELISA readings lower than twofold healthy control (2H-CK) were considered undetectable by indirect ELISA. D-CK represents the commercialized SMYEV control purchased from Bioreba. D-BEP represents the bacterial-expressed SMYEV coat protein.

顯示受測的草莓罹病組織可檢出有 SMYEV，證實國內之草莓已有 SMYEV 發生，雖然所檢出病毒的樣品，不一定會引起明顯病徵，但因受病毒感染，草莓生長勢相對較弱，此與國外文獻記載草莓罹染病毒後不顯現病徵情形一致 (Tzanetakis & Martin 2013; Conci *et al.* 2017; Torrico *et al.* 2018)；因此，對於鑑定此病毒或草莓種苗繁殖的品質管控上，透過核酸分子檢測法確認草莓是否帶有此病毒相當重要。

本研究為首次以病毒之核酸分子檢測、核

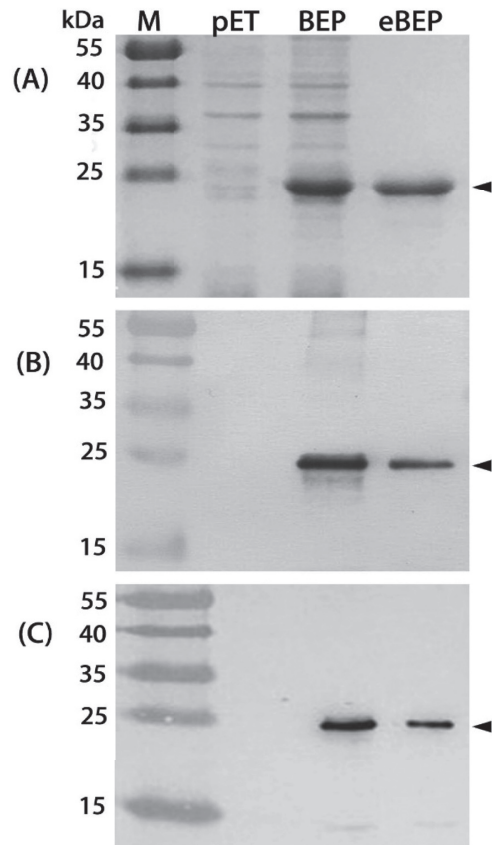


圖 4. 應用細菌大量表現的草莓 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 分離株融合性鞘蛋白之 SDS-PAGE 電泳及西方墨點法分析。(A) SMYEV 融合性表現蛋白 (26.7 kDa；箭頭所指) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與 (B) Bioreba 公司出品和 (C) 自製之 SMYEV 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標識；行 pET：細菌表現之 pET28a(+) 蛋白 (未帶病毒鞘蛋白)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白。

Fig. 4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assay of the bacterial-expressed coat protein (CP) of strawberry mild yellow edge virus (SMYEV). (A) A 26.7-kDa bacterial-expressed fusion protein of SMYEV-CP (arrowed) was observed in the SDS-PAGE assay. The proteins were reacted with (B) the purchased polyclonal antibody of SMYEV from Bioreba, and (C) the antibody #206 prepared in this study. Lane M: protein markers; lane pET: IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28a(+) without SMYEV-CP insert; lane BEP: IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with SMYEV-CP insert; lane eBEP: the purified bacterial-expressed SMYEV-CP.

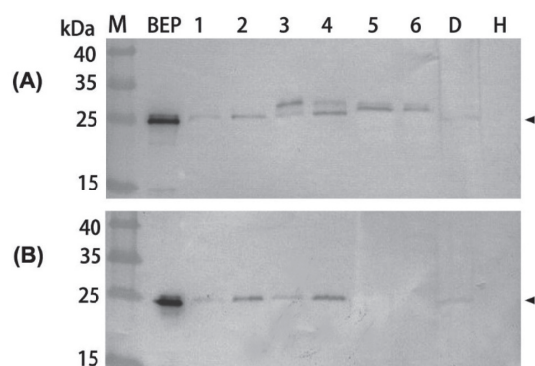


圖 5. 以不同來源之多元抗體進行西方墨點法，檢測草莓罹病組織之 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV)。受測樣品分別與 (A) 市售 (Bioreba) 和 (B) 自製 (#206) 之多元抗體反應。行 M：蛋白質分子量標幟；行 BEP：純化後之細菌表現 SMYEV 鞘蛋白；行 1-6：罹染 SMYEV 之草莓葉片組織；行 D：市售 SMYEV 正對照品 (Bioreba) (箭頭所指)；行 H：健康草莓組織。

Fig. 5. Detection of strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) by western blotting. The tested samples were reacted with (A) the polyclonal antibodies of SMYEV purchased from Biovera and (B) self-prepared in this study (#206). Lane M: protein marker; lane BEP: the purified lysate of bacterial-expressed SMYEV-CP; lanes 1-6: virus-infected strawberry leaf tissues; lane D: the positive control of SMYEV (arrowed) purchased from Bioreba Ltd.; lane H: healthy strawberry control.

苷酸定序及多元抗體生化檢測證明國內草莓有發生 SMYEV 之紀錄；目前國內栽培之草莓除 SMYEV 外，尚未有其他病毒病害之紀錄。

本研究也首度完成國內自製 SMYEV 多元抗體及 RT-PCR 檢測用試劑，此將有助於可提升我國對 SMYEV 之自主檢測能力，增進草莓無特定病毒種苗生產之品質。尤其於 2018 年 8 月經由行政院農業委員會動植物防疫檢疫局公告之「草莓種苗病害驗證作業須知」中，規範 SMYEV 為台灣產的草莓健康種苗之病毒檢定對象，本研究所開發之 SMYEV 引子對及其 RT-PCR 檢測法已應用為本驗證制度之病毒檢測標準，為確保台灣生產草莓種苗之健康品質而把關。

引用文獻

Bolton, A. T. 1974. Effects of three virus diseases and their

combinations on fruit yield of strawberries. *Can. J. Plant Sci.* 54:271-275. doi:10.4141/cjps74-043

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., 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) doi:10.6156/JTAR/2016.06502.09

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

Conci, V. C., C. E. Luciani, M. C. Merino, M. G. Celli, M. C. Perotto, A. K. Torrico, E. Pozzi, G. Strumia, A. C. Dughetti, F. Asinari, L. R. Conci, F. D. Fernandez, S. M. Salazar, N. G. Meneguzzi, and D. S. Kirschbaum. 2017. Advances in characterization and epidemiology of strawberry viruses and phytoplasmas in Argentina. *Acta. Hort.* 1156:801-810. doi:10.17660/ActaHortic.2017.1156.118

Dara, S. K. 2015. Virus decline of strawberry in California and the role of insect vectors and associated viruses. *Plant Health Prog.* 16:211-215. doi:10.1094/PHP-MR-15-0023

Fránová, J., J. Příbylová, and I. Koloniuk. 2019. Molecular and biological characterization of a new strawberry cytorhabdovirus. *Viruses* 11:982. doi:10.3390/v11110982

Freeman, J. A. and F. C. Mellor. 1962. Influence of latent viruses on vigor, yield and quality of British Sovereign strawberries. *Can. J. Plant Sci.* 42:602-610. doi:10.4141/cjps62-103

Hepp, R. F. and R. R. Martin. 1992. Occurrence of strawberry mild yellow-edge associated virus in wild *Fragaria chiloensis* in South America. *Acta Hort.* 308:57-60. doi:10.17660/ActaHortic.1992.308.6

Jelkmann, W., E. Maiss, and R. R. Martin. 1992. The nucleotide sequence and genome organization of strawberry mild yellow edge-associated potyvirus (SMYEV). *J. Gen. Virol.* 73:475-479. doi:10.1099/0022-1317-73-2-475

Krczal, H. 1980. Transmission of the strawberry mild yellow edge and strawberry crinkle viruses by the strawberry aphid *Chaetosiphon fragaefolii*. *Acta Hort.* 95:23-30. doi:10.17660/ActaHortic.1980.95.2

- Lacourt, I., P. J. M. Bonants, M. P. Van Gent-Pelzer, D. E. L. Cooke, M. Hagenaar-De Weerd, L. Surplus, and J. M. Duncan. 1996. The use of nested primers in the polymerase chain reaction for the detection of *Phytophthora fragariae* and *P. cactorum* in strawberry. *Acta Hort.* 439:829–838. doi:10.17660/ActaHortic.1997.439.137
- Lamprecht, S. and W. Jelkmann. 1997. Infectious cDNA clone used to identify strawberry mild yellow edge-associated potyvirus as causal agent of the disease. *J. Gen. Virol.* 78:2347–2353. doi:10.1099/0022-1317-78-9-2347
- Martin, R. R. and I. E. Tzanetakis. 2006. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Dis.* 90:384–396. doi:10.1094/PD-90-0384
- Posthuma, K. I., A. N. Adams, Y. Hong, and M. J. Kirby. 2002. Detection of *Strawberry crinkle virus* in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathol.* 51:266–274. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00725.x
- Ragab, M., K. El-Dougdoug, S. Mousa, A. Attia, I. Sobolev, S. Spiegel, S. Freeman, M. Zeidan, I. E. Tzanetakis, and R. R. Martin. 2009. Detection of strawberry viruses in Egypt. *Acta Hort.* 842:319–322. doi:10.17660/ActaHortic.2009.842.58
- Thompson, J. R., S. Wetzell, M. M. Klerks, D. Vašková, C. D. Schoen, J. Špak, and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *J. Virol. Methods* 111:85–93. doi:10.1016/S0166-0934(03)00164-2
- Torraco, A. K., S. M. Salazar, D. S. Kirschbaum, and V. C. Conci. 2018. Yield losses of asymptomatic strawberry plants infected with *Strawberry mild yellow edge virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 150:983–990. doi:10.1007/s10658-017-1337-z
- Tzanetakis, I. E. and R. R. Martin. 2013. Expanding field of strawberry viruses which are important in North America. *Int. J. Fruit Sci.* 13:184–195. doi:10.1080/15538362.2012.698164

Identification and Development of Detection Reagent for Strawberry Mild Yellow Edge Virus

Chin-Chih Chen^{1,*}, Jyh-Nong Tsai², Mei-Ya Chen³, Jia-Yi Liao³, and Fen-Lang Chiang³

Abstract

Chen, C. C., J. N. Tsai, M. Y. Chen, J. Y. Liao, and F. L. Chiang. 2022. Identification and development of detection reagent for strawberry mild yellow edge virus. *J. Taiwan Agric. Res.* 71(3):199–207.

Strawberry (*Haemanthus multiflorus* Martyn.) samples showed brown mosaic or symptomless were collected in Miaoli, Taiwan. Using the newly designed primer pair SMYCPu/SMYCPd specific to strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), an expected 838-bp DNA fragment containing the full-length coat protein (CP) gene of SMYEV was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The nucleotide (nt) sequence of the amplicon was sequenced to verify the identity of the virus. Besides, the primer pair SMY273u/SMY273d was designed for RT-PCR to detect SMYEV in strawberry fields of Miaoli and Wufeng, Taichung, with a detection rate of 10.6%. On the other hand, the SMYEV CP gene with a length of 726 nt was cloned into the expression vector pET28a(+), and transformed into *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) cells to express a fusion protein of SMYEV CP with a molecular weight of about 26.7 kDa. The fusion protein was purified and injected into a New Zealand white rabbit to produce a polyclonal antibody against SMYEV CP (#206). In western blotting assays, the self-produced #206 as well as a commercially available polyclonal antibody (Bioreba Ltd., Reinach, Switzerland) can react positively with the *E. coli*-expressed SMYEV-CP fusion protein and the commercial positive control of SMYEV, and has no non-specific reaction to healthy strawberry tissue. However, due to the low virus concentration in strawberries, these two antibodies failed to detect SMYEV in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA). Here, we first report the molecular identification and incidence of SMYEV in domestic strawberries. The polyclonal antibody and the RT-PCR methods developed in this study can be applied to establish the capability of the detection of SYMEV in strawberry plants. The developed methods could be useful in strawberry propagation to produce SYMEV-free seedlings.

Key words: Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Molecular identification, Polyclonal antibody, RT-PCR detection.

Received: October 16, 2021; Accepted: February 25, 2022.

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

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

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

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