台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 60(2):89–100 (2011)

感染百子蓮之 *Nerine virus* X 病毒之血清學與分子生物學鑑定及其檢測技術之建立[1]

江芬蘭[2,4] 張清安[3,4] 鄭櫻慧[2] 陳金枝[2,5]

摘　要

江芬蘭、張清安、鄭櫻慧、陳金枝。2011。感染百子蓮之 *Nerine virus* X 病毒之血清學與分子生物學鑑定及其檢測技術之建立。台灣農業研究 60:89–100。

本研究於梅峰地區採集獲得葉片呈現黃綠斑駁病徵之百子蓮植株，取其葉片接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.)，經連續 3 次單斑接種後獲得一分離株 (AL-1)。將 AL-1 回接於百子蓮實生苗植株亦可造成與田間病株類似之斑駁病徵。以接種 AL-1 之奎藜葉片為材料，利用高低速交替及硫酸銫等密度平衡離心進行病毒純化，純化試料經電子顯微鏡觀察，病毒顆粒為絲狀，長度預估約 508 nm。純化病毒經 SDS-PAGE 電泳分析顯示其鞘蛋白乃由單一種蛋白質基本單位 (protein subunit) 所構成，分子量估算為 25 kDa。將純化之 AL-1 病毒顆粒注射於白兔後所製備之多元抗體於 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)、SDS-免疫擴散反應 (SDS-immunodiffusion test) 及西方轉漬法反應中，可與同源之純化病毒抗原及百子蓮罹病株發生反應。以萃取自接種 AL-1 之奎藜病葉之全量核酸為模版，利用數組本研究所設計之引子對分別進行病毒全長度基因體之 RT-PCR 核酸增幅與選殖，定序結果確認 AL-1 分離株之全長基因體約由 6577 個核苷酸所組成 (不包含 polyA)，內含 5 個轉譯架構 (ORF 1–5) 分別對應 5 種基因產物。其中 ORF 2–3 含有彼此重疊之序列，此等基因體結構與已知之 *Potexvirus* 屬病毒相同。經比對 GenBank 上已登錄之其他 10 種 potexviruses 全長基因體序列後顯示，AL-1 基因體之核苷酸與胺基酸序列均與 *Nerine virus* X (NVX) 最為相近，相同度高達 93%以上。針對 AL-1 之 ORF1 及鞘蛋白基因所分別設計之二種引子對，均可以專一性地檢測出 AL-1。基於前述 AL-1 分離株之生物特性、血清學以及全長度基因體之分析結果，證實本研究於呈現黃綠條紋及斑駁病徵之百子蓮所分離之病毒應為 NVX 病毒之一個系統，此乃 NVX 於台灣發生之首度報導。

關鍵詞：百子蓮、病毒病、*Nerine virus* X 病毒、多元抗體、全長基因體、RT-PCR 檢測。

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2505 號。接受日期：100 年 4 月 19 日。
2. 本所植物病理組研究助理、副研究員、助理研究員。台灣　台中市。
3. 朝陽科技大學生化科技研究所教授兼所長。台灣　台中市。
4. 江芬蘭及張清安於本研究報告同為第一作者之貢獻度。
5. 通訊作者，電子郵件：chinzue@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302803。

前 言

百子蓮 (*Agapanthus africanus* L.) 又名愛情花，為石蒜科百子蓮屬多年生草本植物，原產南非，可生產切花亦可供盆栽及花壇觀賞，近年來逐漸受到消費者青睞，栽培面積有增加趨勢。感染百子蓮的病毒目前已知僅有 *Nerine virus* X (NVX)，病毒引起褪綠條斑病徵 (Fuji *et al*. 2006)。NVX 為 *Potexvirus* 屬成員之一，病毒顆粒體為絲狀，平均長度約 540 nm (Phillips & Brunt 1980)。NVX 首次於荷蘭被發現可感染根希百合 (又稱報春花，*Nerine sarniensis*) (Hakkaart *et al*. 1975; Maat 1976)，隨後在英國被發現可自然感染早花百子蓮 (*Agapanthus praecox* subsp. *orientalis*) (Phillips & Brunt 1980)。

目前已報導 NVX 可感染的寄主包括百子蓮以及根希百合 (Phillips & Brunt 1980; Brunt 1995)，寄主範圍包括蔥科 (Alliaceae)、莧科 (Amaranthaceae)、石蒜科 (Amaryllidaceae)、藜科 (Chenopodiaceae) 及番杏科 (Tetragoniaceae) 等 (Phillips & Brunt 1980)。

關於 NVX 病毒之研究，以往報告僅有其病毒基本特性以及血清製備等基礎資料 (Phillips & Brunt 1980)，及至 2006 年日本學者 Fuji *et al* 發表發生於百子蓮上之 NVX 病毒全長度基因體序列 (Fuji *et al*. 2006)，才更進一步依據分子生物學之特性確立此病毒與其他 potexviruses 之差異，使得對於此病毒之分類地位有更完備之記錄。本研究於國內之梅峰地區所採得之百子蓮罹病株，也證實於台灣所種植之百子蓮有 NVX 之發生。本研究針對此病毒分離株之病毒純化、抗血清製備以及其血清檢測技術之實用性評估、全長度基因體之選殖與定序、分子特性解析、以及專一性引子對應用於病毒核酸檢測等方面有更詳盡之研究。

材料與方法

材料來源、保存方法與接種試驗

本研究於 2004 年自位於南投縣之梅峰地區，採得葉片出現黃綠條紋及斑駁病徵之百子蓮植株為材料，取病葉切成約 1 cm 正方形小組織塊，浸漬於 50% glycerol 溶液中並保存於-20℃，作為長期保存材料。接種時將罹病葉以 0.05 M 之磷酸鉀緩衝液 (potassium phosphate buffer, pH 7.5)，以 1：10 (g/mL) 比例研磨成汁液，利用汁液機械接種法接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.)，約 6 天後於葉片產生黃化局部病斑 (local lesion)，經連續 3 次單斑分離接種後獲得一分離株 AL-1，作為本研究各項試驗用之代表性病毒株。AL-1 分離株另以汁液機械接種法接種於番杏 (*Tetragonia expensa*) 以及健康的百子蓮植株，觀察病徵之表現。

病毒純化及電子顯微鏡觀察

將 AL-1 病毒分離株接種繁殖於奎藜葉片作為純化材料，利用高低速交替及硫酸銫等密度平衡離心進行病毒純化，純化方法如以往之研究 (Chen & Chang 1998)。取適量已純化之 AL-1 分離株病毒顆粒被覆於 300 mesh 之銅網上，以 2% PTA (phosphotungstic acid) 進行陰染 (Hall *et al*. 1945)，在 40,000 倍率之穿透式電子顯微鏡 (HITACH H-7000, Tokyo, Japan) 下進行病毒顆粒型態的觀察，並計算 100 個病毒顆粒體，估算病毒之長度。

抗血清製備

取純化之百子蓮 AL-1 分離株病毒 1 mL (1 mg/mL) 與 1 mL 完全乳化劑 (complete Frenud's adjuvant) (Sigma, Sigma-ALDRICH, Inc., St. Louis, USA) 充分混合，將乳化完全之病毒抗原注射於兔子皮下肌肉。每隔一週注射 1 次，第二次後之注射以不完全乳化劑 (incomplete Frenud's adjuvant) (Sigma) 取代，第

4 次注射後一週開始進行採血。每次採血，由兔子耳朵之靜脈採得 30–40 mL 之血液，於 37℃ 水浴靜置 4 小時，取其上清液並經過離心 (8000 rpm，10 分鐘) 後，取血清液分裝保存於 -20℃，供血清反應測試之需。

血清檢測

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 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，加入 EIA 反應盤內 (100 μL/ well) 進行覆膜反應 (coating reaction)，其次分別以對應 AL-1 分離株抗體之免疫球蛋白 (IgG) 進行 ELISA 反應，詳細之測定流程如已發表之報告所述 (Chen & Chang 1998)。

SDS-免疫擴散反應法 (SDS-immuno-diffussion test)：分別取 1 g 之植物組織於研缽內與 1 mL 之 3% SDS 溶液及 1 mL 之二次蒸餾水研磨均勻，再以兩層紗布過濾，取其濾液置耐熱指形管內以熱水 (95–100℃) 悶 3 分鐘，做為 SDS 處理過之抗原 (SDS-treated antigens)；純化病毒則取病毒純化液置耐熱指形管內，與 3% SDS 溶液及 1 mL 之二次蒸餾水以 1：1：1 (體積比) 混合均勻後，同樣以以熱水 (95–100℃) 悶 3 分鐘。SDS 處理過之抗原，再與 AL-1 病毒分離株之抗血清進行 SDS-免疫擴散反應 (Purcifull & Batchelor 1977)。

西方轉漬法 (Western blotting)：將 0.1 g 之罹病葉組織，以液態氮磨碎，加入 200 μL 之樣品處理液 (240 mM Tris HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 4% β-Mercaptoethanol)。再取 100 μL 研磨液加入等體積之 LDS 溶液 (Laemmli 1970)，混勻後進行電泳。SDS-PAGE 電泳後，將膠體轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，以 AL-1 分離株之抗血清進行免疫反應。

AL-1 全長度基因體定序分析

取 AL-1 純化病毒，以核酸純化試劑組萃取其核酸 (QIAamp viral RNA mini kit, Qiagen, Hilden, Germany)，以此純化病毒之核酸為模版，首先利用逢機引子 OPA8 (5'-GTGACGTAGG) 進行 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 反應，所獲得之 658 bp DNA 片段經定序後與 GenBank 基因庫比對結果，確知此 DNA 片段乃屬於 *Potexvirus* ORF1 (replicase) 之部分序列。

繼續利用此 658 bp DNA 片段所定序出之核苷酸序列，於其近 3' 端設計 AFORF658-1 引子 (5'GAAGTAATCAAAGCCAAGC)，並配合下游引子 Oligo-d $(T)_{14}$ (5'GCGGCCGCT TTTTTTTTTTTTT)，以純化病毒之核酸為模版，進行病毒 3'端基因體之 RT-PCR 增幅，預估可獲得 2.6 kbp 之 DNA 片段產物。將 RT-PCR 增幅所得之 2.6 kbp 之 DNA 片段，經選殖與定序後，發現其與已登錄於 GenBank 上之 *Nerine virus* X (Acc. No. AB219105) 最為相近，因此進一步利用自行選殖之 658 bp DNA 片段之序列，取其近 5'端設計 AFORF658-2 引子 (5' TGATATAGCGTCGGGGTGAAAG)，並利用 NVX (Acc. No. AB219105) 已知對應 ORF1 之序列設計 NVXORF1-u1 引子 (5'CAC AGCGGGATAAACTGGACCAGATT)，應用 AFORF658-2/NVXORF1-u1 之引子對預估可針對 AL-1 之 ORF1 基因上游增幅出約 1.5 kbp 之核酸片段，將此 1.5 kbp 核酸片段產物經選殖並定序後，繼續依據所得序列設計 AFORF1-d 引子(5' CTTGACGTGTAAGCAGCCTAA C)，並借用 NVX (AB2191055) 基因體 5'端 25 個核苷酸作為引子 (NVX5'end, 5'AAA ACCAACACAACCTAAAACCAAA)，利用 NVX5'end/AFORF1-d 引子對進行 RT-PCR 增幅，所增幅出之核酸片段預期將對應 AL-1 基因體 5'端約 2.3 kbp 之產物，將 RT-PCR 所得之 DNA 片段產物進行選殖與定序。

本試驗進行 AL-1 病毒分離株全長度基因

體之 RT-PCR 增幅、選殖與定序，其中 RT-PCR 增幅反應乃利用具有校正除錯功能之單步驟 RT-PCR 試劑組 (One-Step RT-PCR kit, Invitrogen, California)。反應時，於每一 50 μL 反應液中分別加入 2 μL RNA、25 μL 2× Reaction Mix、1 μL RT/Platinum® Taq HiFi mix、及各 1 μL 之 20 μM AL-c-up 及 Oligo-d (T)14 引子對，於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中進行 30 個 PCR 循環反應。反應程序為 50℃下合成 cDNA 30 分鐘，94℃下變性 1 分鐘，53℃下煉合 1 分鐘，72℃下聚合 2 分鐘，最後一個循環中之 72℃聚合反應延長為 6 分鐘。將 RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段，選殖於 pOSI-T 載體 (GeneMark Com., Taipei , Taiwan)，並轉殖於 *Escherichia coli* DH5α 宿主中，再以篩選性培養基及 *Eco*RI 限制酵素切割篩選具有與 RT-PCR 預估產物相同大小之轉殖株，送交明欣生物技術公司進行核苷酸序列分析 (ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀，Perkin-Elmer, CA, USA；及其配用之放射性標幟反應試劑組 ABI PRISM BioDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction kit)，所得之核酸序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc. Wesconsin, USA) 核酸序列分析軟體進行分析比對。

AL-1 全長度基因體與其他不同 potexviruses 之比對分析

將 AL-1 全長度基因體分別針對 ORF 1 (replicase protein)、ORF 2 (triple gene block protein 1)、ORF 3 (triple gene block protein 2)、ORF 4 (triple gene block protein 3)、ORF 5 (coat protein) 之核苷酸與胺基酸序列，與 GenBank 上已登錄並與 AL-1 基因體相同度較相近之 10 種不同的 potexviruses，包括 *Nerine virus* X (NVX)、*Potato virus* X (PVX)、*Cymbidium mosaic virus* (CymMV)、*Clover yellow mosaic virus* (ClYMV)、*Hosta virus* X (HVX)、*Opuntia virus* X (OVX)、*Cactus virus* X (CVX)、*Cassava common mosaic virus* (CsCMV)、*Bamboo mosaic virus* (BaMV)、*Foxtail mosaic virus* (FoMV) 等進行基因相同度之分析比對，以瞭解 AL-1 之分類特性。

AL-1 專一性引子對之設計與測試

本試驗針對百子蓮罹病株所分離出之 AL-1 病毒分離株之基因體序列，以對應 ORF 1 (replicase) 及 ORF 5 (coat protein) 之核苷酸序列，分別設計引子對以進行田間罹病株之 RT-PCR 檢測。對應 ORF 1 之引子對為 ALORFup/ALORFdw (5' TGT GGCAGGCTTGT AGAGA /5' GCTTGGCTTTGATTACTT C)，對應鞘蛋白的引子對為 ALCPup/ALCPdw (5' TCTTCCCGCACAATCCAAAA/ATAGGGTG CAGAGCTGCTGT)。另以國外研究學者已發表之 *Potexvirus* 簡併式引子對 Potex 4/Potex 5 (5' AGCATGGCGCCATCTTGTGACTG/5'CTGAA GTCACAATGGGTGAAGAA) (Miglino *et al*. 2005) 作為對照。將不同來源之 potexviruses 包括 CVX、BaMV、CymMV、PVX 以及 AL-1 罹病組織以上述不同引子對進行 RT-PCR 檢測，反應條件如前述。RT-PCR 之增幅產物之預估分子量大小，以 ALORFup/ALORFdw 反應者為 429 bp、以 ALCPup/ALCPdw 反應者為 469 bp、以 Potex 4/Potex 5 反應者為 280 bp。

結　果

病毒接種、純化及電子顯微鏡觀察

取葉片出現黃綠條紋及斑駁病徵之百子蓮罹病組織 (圖 1A)，進行汁液機械接種於奎藜及番杏葉片，約 6 天後於植株葉片出現褪綠黃化斑點，取奎藜上之單斑進行接種可成功回接於百子蓮植株，於 30 天後造成葉片之黃綠斑駁病徵 (圖 1B)，經 ELISA 檢測出有病毒性反應。由接種 AL-1 分離株之奎藜葉片 (圖 2A) 之 120 g 葉片組織中，可純化出 6.5 mg 之病毒。針對



圖 1. 感染 *Nerine virus* X 病毒 AL-1 分離株之百子蓮植株病徵。(A) 田間罹病株葉片呈現黃綠條紋及斑駁病徵；(B) 百子蓮健康苗接種 NVX AL-1 分離株 30 天後於新葉出現之黃綠斑駁病徵。

Fig. 1. Symptoms on leaves of African lily infected by AL-1 isolate of *Nerine virus* X. (A) Symptoms on field plants; (B) Chlorotic mottle symptom developed at 30days after inoculation.

AL-1 分離株之純化病毒顆粒，進行電子顯微鏡觀察，病毒顆粒為呈絲狀型態，其長度約為 508 nm (圖 2B)，符合馬鈴薯 X 屬病毒之平均長度約 470–580 nm 之範圍 (Brunt 1995)。純化病毒經 SDS-PAGE 電泳分析顯示其鞘蛋白乃由單一種蛋白質基本單位 (protein subunit) 所構成，分子量估算約為 25 kDa (圖 2C)。

抗血清製備及血清檢測分析

將免疫注射後製備所得對應百子蓮 AL-1 病毒分離株之抗血清，進行 ELISA、SDS-免疫擴散反應法及西方轉漬法等血清檢測反應。以 AL-1 病毒分離株之抗血清所純化的免疫球蛋白 (IgG) 進行 ELISA 反應，可與同源奎藜單斑抗原及田間百子蓮病株發生反應，但不與百子蓮實生苗健康對照及 4 種 potexviruses (包括 CVX、BaMV、CymMV 及 PVX) 之罹病組織之病毒抗原反應 (結果未出示)，此血清反應結果與西方轉漬法之結果相同 (圖 2D)。進行 SDS-免疫擴散反應法測試中，AL-1 血清可與純化病毒、繁殖於奎藜以及番杏葉片之 AL-1 抗原以及田間百子蓮病株發生免疫沈澱反應，且沈澱帶兩兩間均產生同源性的融合現象 (identical fusion) (圖 3)，顯示田間罹病株內有與 AL-1 分離株同源之病毒存在，AL-1 血清與健康組織則無白色沈澱反應。此等血清試驗結果顯示 AL-1 病毒抗血清，可實際應用於百子蓮罹病株之病毒發生檢測。

全長度基因體分析以及鞘蛋白基因比對鑑定

AL-1 分離株之全長基因體共解得約 6577 個核苷酸 (不包含 poly-A tail)，登錄於 GenBank 取得序號為 HQ166711，其中 5'端 25 個核苷酸序列乃借用 GenBank 上已登陸發表之 *Potexvirus* AB219105 基因體 5'頂端 25 個核苷酸為引子 (NVX5'end) 與 AL-1 之下游引子(AFORF1-d) 進行 RT-PCR 而得。所解得之 AL-1 全長度基因體序列經分析後，發現內含五個轉譯架構分別對應 *Potexvirus* 屬病毒基因體之 ORF 1 (replicase protein, nt 88-4599)、ORF 2 (triple gene block protein 1, nt 4635-5321)、ORF 3

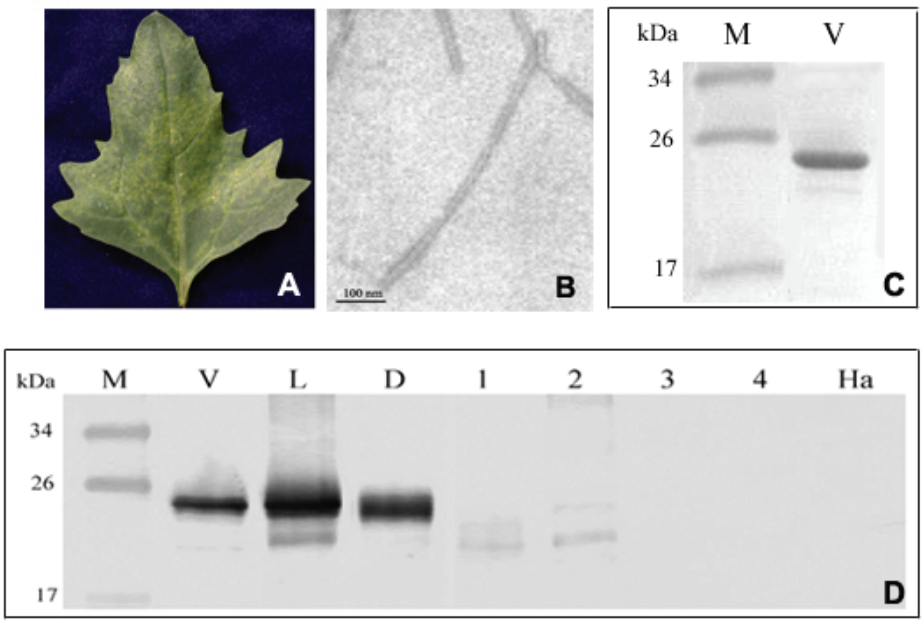


圖 2. AL-1 病毒分離株之接種、純化病毒電顯觀察與蛋白質電泳分析。(A) 接種在奎藜上所產生之局部病斑；(**B**) AL-1 分離株之純化病毒絲狀顆粒電子顯微鏡觀察；(C) AL-1 純化病毒於 SDA-PAGE 之電泳分析，病毒蛋白質分子量預估為 25 kDa；(D) 西方轉漬法檢測 AL-1 純化病毒、單斑病組織及田間百子蓮罹病組織之病毒，以 AL-1 抗血清進行免疫分析。M：蛋白質標準分子量；V：AL-1 純化病毒；L：AL-1 分離株感染之奎藜單斑；D：百子蓮離病株；1：CVX (*Cactus virus* X)；2：BaMV (*Bamboo mosaic virus*)；3：CymMV (*Cymbidium mosaic virus*)；4：PVX (*Potato virus* X)；Ha：健康百子蓮葉組織。

Fig. 2. Bioassay, TEM observation, electrophoresis and immuno analysis of *Nerine virus* X isolate AL-1 by Western blotting. (A) Local lesions shown on the leaf of *Chenopodium quinoa* developed by the inoculation of AL-1; (B) Morphology of a purified virus particle; (C) SDS-PAGE analysis of the purified AL-1 particles showing the subunit of viral coat protein; (D) Western blotting analysis using AL-1 antiserum; purified virus sample of AL-1 (lane V), AL-1-infected *C. quinoa* leaf tissue (lane L), AL-1-infected African lily tissue (lane D), and different potexviruses including *Cactus virus* X (lane 1), *Bamboo mosaic virus* (lane 2), *Cymbidium mosaic virus* (lane 3) and *Potato virus* X (lane 4) and preparation of healthy African lily (lane Ha). Lane M, protein markers.

(triple gene block protein 2, nt 5302-5658)、ORF 4 (triple gene block protein 3, nt 5438-5797) 及 ORF 5 (coat protein, nt 5787-6446)。

AL-1 之全長度基因體與目前已登錄之 *Potexvirus* 病毒比對結果，與由日本學者 Fuji *et al.* 於 2006 年發表之 *Nerine virus* X (GenBank Acc. No. AB21910) 最相近，全長度核苷酸之序列相同度高達 98.9% (表 1)。進一步與 GenBank 已登錄之 10 種 potexviruses 包括 NVX (AB219105)、BaMV (D26017)、ClYMV (NC_001753)、CsCMV (U23414)、CymMV (EF125178)、CVX (AF308158)、FoMV (EF630359)、HVX (AJ620114)、OVX (AY366209)、PVX (M95516) 等進行 ORF 1 至 ORF 5 之相同度比對，結果顯示無論是核苷酸或胺基酸序列，AL-1 與 NVX 病毒在此等區域之相同度均高達 93%以上；但與其他 9 種 potexvirues 之胺基酸相同度於 ORF 1 為 37.6–43.0%、ORF 2 為 20.0–30.7%、ORF 3 為 29.6–42.4%、ORF 4 為 7.4-21.3%、ORF 5 為 15.6-–38.0%。

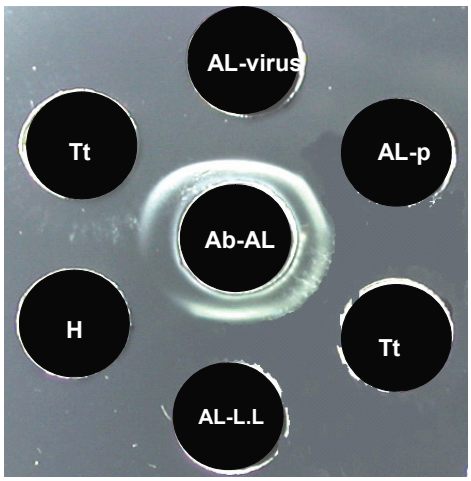


圖 3. SDS-免疫擴散反應分析 AL-1 病毒分離株與其抗血清之反應。中央穴加入 AL-1 抗血清 (Ab-AL)，周圍六穴乃分別加入經 SDS 處理後之 AL-1 純化病毒 (AL-virus)、百子蓮罹病組織 (AL-p)、AL-1 感染之番杏罹病單斑組織 (Tt)、AL-1 感染奎藜之局部病斑 (AL-L.L) 及健康奎藜對照抗原 (H)。AL-1 抗血清與純化之 AL-1 病毒、田間百子蓮病株、同源奎藜病組織及 AL-1 感染之番杏病組織等產生同源性之免疫沈澱反應。

Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-immunodiffusion test of the antiserum against AL-1 isolate of *Nerine virus* X. The central well was filled with the antiserum against AL-1 (Ab-AL). The peripheral wells were filled with SDS-treated antigens including purified AL-1 virion (AL-virus), field diseased leaf tissues of African lily (AL-p), AL-1-infected *Tetrogonia* leaf tissues (Tt), AL-1-induced local lesion tissue of *Chenopodium quinoa* (AL-L.L), and tissue of healthy African lily (H).

表 1. 百子蓮病毒 AL-1 分離株與其他不同 potexviruses 間在基因體內 5 個轉譯架構 (Open reading frame) 上之序列分析比較。

Table 1. Sequence analysis and comparison on the five different open reading frame (ORF) of *Nerine virus* X isolate AL-1 and other potexviruses.

		Percent identity [z]									
		Nucleotide					Amino acid				
Potexvirus [y]	Accession no.	ORF 1	ORF 2	ORF 3	ORF 4	ORF 5 (CP)	ORF 1	ORF 2	ORF 3	ORF 4	ORF 5 (CP)
NVX	AB219105	98.7	99.0	99.7	99.7	99.1	98.5	93.0	100.0	99.2	95.9
BaMV	D26017	51.1	46.8	52.1	22.7	43.7	37.6	23.5	37.9	8.3	20.1
ClYMV	NC_001753	52.9	43.3	52.5	27.5	51.6	40.2	25.7	42.4	11.6	34.1
CsCMV	U23414	52.9	46.9	47.3	40.1	49.5	40.9	27.4	33.1	16.5	32.3
CymMV	EF125178	52.3	45.9	49.7	38.2	52.6	41.3	20.0	32.2	21.3	36.7
CVX	AF308158	54.2	50.4	47.4	28.5	49.1	41.2	30.3	35.2	10.7	29.3
FoMV	EF630359	50.7	49.6	47.9	22.1	41.5	38.3	28.5	29.6	7.4	15.6
HVX	AJ620114	53.5	49.5	48.8	31.1	49.0	39.5	26.9	34.4	15.7	32.4
OVX	AY366209	54.7	48.4	43.8	24.2	49.6	41.1	30.7	32.8	10.7	30.9
PVX	M95516	54.2	47.0	49.7	31.9	50.7	43.0	22.2	32.8	8.3	38.0

[z] Values were obtained using the analysis program of Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Wesconsin, USA).
[y] Potexviruses including *Nerine virus* X (NVX), *Bamboo mosaic virus* (BaMV), *Clover yellow mosaic virus* (ClYMV), *Cassava common mosaic virus* (CsCMV), *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Cactus virus* X (CVX), *Foxtail mosaic* virus (FoMV), *Hosta virus* X (HVX), *Opuntia virus* X (OVX), and *Potato virus* X (PVX).

AL-1 之 ORF2-3、ORF 3-4 間之核酸序列相互間有重疊之處，為 *Potexvirus* 病毒之特性之一，稱為 triple gene block (TGB)，並且為其所屬 *Alphaflexiviridae* 科病毒的高保留區特性 (Abou Haidar & Gellaty 1999)。由核酸序列分析比對結果與 AL-1 之分子特性顯示其確屬於 *Potexvirus* 的成員之一，且為 NVX 病毒之不同分離株。

RT-PCR 專一性檢測引子之設計與應用

本研究證實 AL-1 可與 *Potexvirus* 簡併式引子對 Potex 4/Potex 5 反應，產物大小約 280 bp 核酸片段 (圖 4A)。針對 AL-1 基因體對應 ORF 1 (replicase protein) 以及 ORF 5 (coat protein) 區域所設計之引子對，均可專一性地檢測出 AL-1 之核酸片段產物，獲得與預估大小相同之 DNA 片段產物，以 ALORFup/ALORFdw 增幅出 ORF1 上約 429 bp 之核酸片段 (圖 4B)，而以 ALCPup/ALCPdw 增幅出 CP 上約 469 bp 之核酸片段。從 AL-1 純化病毒、AL-1 田間自然感染之罹病組織，以及繁殖於奎藜葉片上之單斑等均可檢出 AL-1 病毒相對應之核酸片段訊號，但此二引子對不與 CVX、BaMV、CymMV 以及 PVX 等 4 種不同的 potexviruses 病毒之核酸反應 (圖 4C)，顯示此二組引子對可用於百子蓮上作 NVX 病毒之專一性檢測。

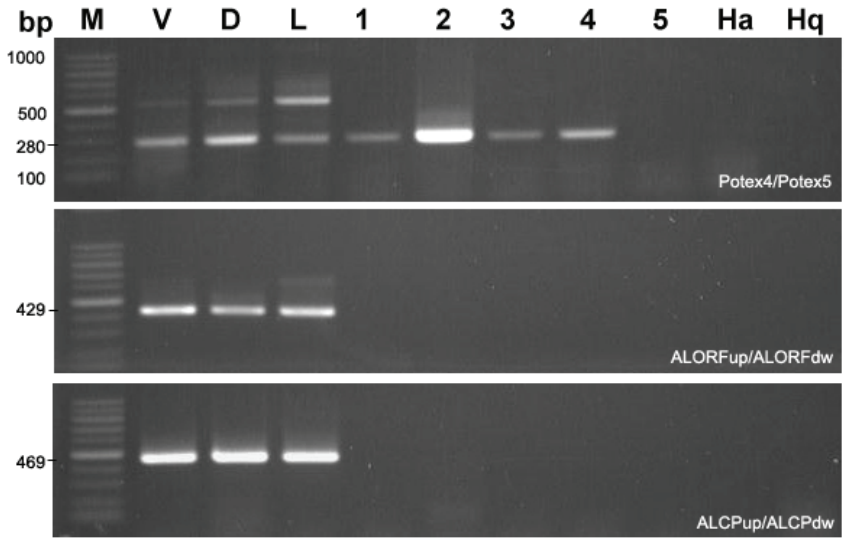


圖 4. 不同引子對進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 檢測百子蓮 *Nerine virus* X 病毒之電泳分析結果。M：100 bp DNA 標準標幟；V：AL-1 純化病毒；D：百子蓮罹病株葉片組織；L：AL-1 分離株感染之奎藜單斑；1：CVX (*Cactus virus* X)；2：BaMV (*Bamboo mosaic virus*)；3：CymMV (*Cymbidium mosaic virus*)；4：PVX (*Potato virus* X)；Ha：健康百子蓮葉組織；Hq：健康奎藜葉組織。

Fig.4. Amplification result of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) by the use of three sets of primer for the detection of *Nerine virus* X (NVX) and several other potexviruses. A 280 bp DNA product was consistently amplified by potexvirus-specific degenerated primers (Potex 4/ Potex 5) from AL-1 and four different potexviruses including CVX, BaMV, CymMV, and PVX. Amplicons of 429 bp and 469 bp were obtained by two NVX specific primer pairs of ALORFup/ALORFdw and ALCPup/ALCPdw, respectively. Lane M, 100-bp ladder DNA molecular markers; lane V, purified virus particles of AL-1; Lane 2, field collected African lily tissue infected by AL-1; Lane 3, AL-1-induced local lesion tissue of *Chenopodium quinoa*; Lane 1, 2, 3, and 4, four different potexviruses of CVX, BaMV, CymMV and PVX, respectively. Lane Ha and Hq, the healthy controls of African lily and *C. quinoa* leaves, respectively.

討　論

本研究根據電子顯微鏡觀察、血清反應及核酸分子特性分析結果，顯示分離自百子蓮罹病株之 AL-1 病毒分離株，乃屬於馬鈴薯 X 屬病毒的成員之一，且與目前日本學者在日本之百子蓮罹病株上分離鑑定而得之 *Nerine virus* X (NVX) 為相同病毒之不同分離株 (Fuji *et al*. 2006)。

田間採回之百子蓮罹病葉呈現褪綠條紋及斑駁病徵，可成功接種於奎藜形成單斑，也可感染番杏形成褪綠黃色斑點，回接於健康的百子蓮植株出現褪綠斑駁病徵，證實分離到之病毒株乃引起田間病毒病害之病原。另外，本研究以血清學以及分子特性鑑定之方式，在純化病毒、罹病株以及接種於單斑之 AL-1 分離株等不同樣品於 SDS-免疫擴散反應中呈現同源相同病毒之免疫沈澱反應，以及 RT- PCR 反應中對應病毒 ORF 1 及 CP 之兩組專一性引子對均可由此 3 種樣品檢出預估之病毒核酸片段，此等證據顯示田間罹病株確實受到 AL-1 分離株相同病毒之感染。

目前已報告可感染百子蓮之病毒僅有 NVX 的記錄 (Fuji *et al*. 2006; Phillips 1996)。而 NVX 田間可自然感染寄主之種類有紀錄僅有百子蓮以及根希百合，NVX 之傳播途徑主要是經由機械性的汁液傳播或種球帶毒而繁殖，目前記錄上並未能經由蟲媒 (Derk & Maat 1995)、種子或花粉傳播 (Phillips 1996; Brunt 1995)。百子蓮繁殖方式主要以播種及分株兩種方式，利用播種法在短時間內可獲得較多的株數，但需經過 3-4 年才能開花，以分株法繁殖時需注意母本帶毒問題，以避免透過帶毒母本將病毒繁殖於子球。國內目前僅於梅峰地區取得此病毒罹病之樣品，在埔里地區取得之百子蓮樣品並未檢測出此病毒之發生 (未出示結果)。因此有關於 NVX 病毒在國內所栽種之百子蓮發生之實際概況以及其對百子蓮生育之影響，尚待後續更多之調查與研究。

根據百子蓮全長度基因體比對結果顯示，其序列與日本學者 Fuji *et al* 於 2006 年發表之 NVX (GenBank Acc.No. AB21910) (Fuji *et al*. 2006) 全長度 6582 bp 序列之核苷酸序列相同度高達 98.9%。本研究借用此病毒基因體 5'頂端 25 個核苷酸作為引子 NVX5'end (5' AAA ACCAACACAACCTAAAACCAAA)，利用 NVX 5'end/AFORF1-d 引子對進行 AL-1 分離株核酸之 RT-PCR 增幅，成功地選殖出 AL-1 基因體 5'端預估約 2.3 kbp 之核酸片段，而因此與其他之核酸片段整合獲得其全長度之基因體，雖然此 25 個核苷酸不全然是 AL-1 的 5'端序列，但因此可獲得 AL-1 病毒分離株全長度之基因體定序，進一步瞭解其 ORF 1–5 與目前已發表之 NVX 病毒之分類關係，乃屬於相同病毒之不同系統，進而藉此分子生物學之特性釐清 AL-1 病毒分離株之分類地位。

本研究針對百子蓮 AL-1 病毒分離株所製備之抗血清及其核酸檢測用引子對，無法檢測出 BaMV、CVX、CymMV 及 PVX 等 4 種不同的 potexviruses 病毒，而單獨僅專一性地檢出 AL-1，此等 AL-1 檢測試劑的專一性檢測效能，尚待後續更多不同 *Potexvirus* 病毒的加入檢測方能更為明確。目前自製之 AL-1 檢測試劑對於國內栽種之國內所栽培或是進口百子蓮種苗之病毒篩檢，可以有效發揮病毒檢測以及病毒的發生資訊，實際應用於追蹤此病毒可能產生的風險之需。

引用文獻 (Literature cited)

Abou Haidar, M. G. and D. Gellaty. 1999. Potexviruses. p. 1364–1368. *in*: Encyclopedia of Virology. 2nd ed. (Granoff, A. and R. G. Webster, eds). Academic Press. San Diego.

Brunt, A. A. 1995. Major genera of plant viruses. p. 29–66. *in*: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops. (Loebenstein, G., R. H. Lawson,

and A. A. Brunt, eds.) John Wiley & Sons. West Sussex, United Kingdom.

Chen, C. C. and C. A. Chang. 1998. Characterization of a potyvirus causing mild mosaic on tuberose. Plant Dis. 82:45–49.

Derks, A. F. L. M. and D. Z. Maat. 1995. Nerine viruses. p. 335–340. *in*: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops. (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) John Wiley & Sons. West Sussex, United Kingdom.

Fuji, S., K. Shinoda, H. Furuya, H. Naito, and F. Fukumoto. 2006. Complete nucleotide sequence of *Nerine virus* X (NVX-J) isolated from the African lily plant (*Agapanthus campanulatus* L.) in Japan. Arch. Virol. 151:205–208.

Hakkaart, F. A., D. Z. Maat, and F. Quak. 1975. Viruses and meristeum culture of Nerine. Acta. Hortic. 47: 51–53.

Hall, C. E., M. A. Jakus, and E. O. Schmitt. 1945. The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains. J. Appl. Physiol. 16: 459–465.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature 227: 680–685.

Maat, D. Z. 1976. Two potexvirus in Nerine. Acta. Hort. 59:81–82.

Miglino, R., A. Jodlowska, and A. R. Schadewijk. 2005. First report of Narcissus mosaic virus infecting *Crocus* spp. cultivars in the Netherlands. Plant Dis. 89:342.

Phillips, S. 1996. Nerine X potexvirus. p. 825–826. *in*: Viruses of Plants: Descriptions Lists from the VIDE Database. (Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, and L. Watson, eds). CAB International. Cambridge.

Phillips, S. and A. A. Brunt. 1980. Some host and properties of an isolate of Nerine virus X from *Agapanthus praecox* subsp. *orientalis*. Acta. Hort. 110:65–70.

Purcifull, D. E., and D. L. Batchelor. 1977. Immunodiffusion Tests with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Treated Plant Viruses and Plant Viral Inclusions. Fla. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 788. 39 pp.

Serological and Molecular Identification of *Nerine virus* X Infecting African Lily (*Agapanthus africanus* L.) and Development of its Detection Techniques[1]

Fen-Lang Chiang[2,4], An-Chin Chang[3,4], Ying-Huey Cheng[2], and Chin-Chih Chen[2,5]

Abstract

Chiang, F. L., C. A. Chang, Y. H. Cheng and C. C. Chen. 2010. Serological and molecular identification of *Nerine virus* X infecting african lily (*Agapanthus africanus* L.) and development of its detection techniques. J. Taiwan Agric. Res. 60:89–100.

African lily (*Agapanthus africanus* L.), native in South-Africa, is currently a popular bulbous floral crop in Taiwan and many other countries. An African lily exhibiting foliar chlorotic strip and mottle symptom was collected from Mai-Fung nursery of Taiwan University in 2005. A virus isolate, designated as AL-1, was obtained from this plant by establishing a single lesion isolate in *Chenopodium quinoa* Willd. Back inoculation of AL-1 onto seedlings of African lilies confirmed that AL-1 was able to induce chlorotic mottle symptom which was similar to what was observed in the field. Virions of AL-1 were successfully purified from the inoculated tissue of *C. quinoa* by differential and equilibrium centrifugation in cesium sulfate. Elongated virus particles estimated at 508 nm in length were observed from the purified sample under an electron microscope. By SDS-PAGE, molecular weight of AL-1's coat protein was determined as 25 kDa. An antiserum against purified AL-1 virions was prepared in rabbit and shown to react strongly and specifically with its homologous antigens prepared from diseased samples of field-collected or inoculated ones in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), SDS-immunodiffusion, and western blotting tests. Full-length genome of AL-1 was revealed by RT-PCR amplification with random primer and several primer pairs designed in this study according to those closely related virus sequences in the GenBank. Genome of AL-1 was found to compose 6577 nucleotides, excluding the poly (A) tails, in which five open reading frames (ORF) encoding presumably replicase (ORF 1), triple gene blocks (ORF 2–4) and coat protein (ORF 5) were located. This genome structure was equivalent to that of *Potexvirus* and most resembled to *Nerine virus* X (NVX) (Acc. No. AB219105) in the GenBank. The percent identities of nucleotide and amino acid sequences of the full-length genomes between AL-1 and NVX were 98 and 93%, respectively, indicating they were isolates of the same virus. A primer pair for specific detection of AL-1 was designed and shown to be

1. Contribution No. 2505 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: April 19, 2010.

2. Respectively, Research assistant, Associate Researcher, Assistant Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.

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

4. Chiang, F. L. and Chang, C. A. contributed equally to this study as first authors.

5. Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.

useful in routine RT-PCR test. Our results revealed that AL-1 was an isolate of NVX based on the biological and serological characterizations and the molecular analysis of the full-length genomic sequences. To our knowledgement, it's the first report of NVX occurrence in Taiwan.

Key words: African lily, *Agapanthus africanus*, Virus disease, *Nerine virus* X, Polyclonal antiserum, Full-length genome, RT-PCR.