

美人蕉嵌紋病相關之菜豆黃化嵌紋病毒特性之研究

羅尹芝¹、陳滄海^{1*}、張清安²、曾 珍¹

¹ 國立屏東科技大學植物醫學系

² 台中市霧峰區 朝陽科技大學應用化學系

* 聯絡作者, E-mail: thchen@mail.npust.edu.tw

摘 要

羅尹芝、陳滄海、張清安、曾 珍。2018。美人蕉嵌紋病相關之菜豆黃化嵌紋病毒特性之研究。植物醫學60(2): 23-30。

美人蕉 (*Canna* spp.) 為一年或多年生之美人蕉科草本觀賞植物。屏東田間美人蕉嵌紋病葉以奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 進行單斑分離, 獲得一種病毒顆粒長度約為750-830 nm的絲狀病毒, 暫稱為CA-FT分離株。該病毒熱不活化溫度為55°C, 耐稀釋度為10⁻⁴, 24°C下活性可維持1天, -80°C下則可保存6個月。機械接種17科68種供試植物, 僅藜科之奎藜、紅藜 (*C. amaranticolor*)、綠藜 (*C. murale*) 可被感染, 於接種葉出現黃斑病徵。電子顯微鏡觀察美人蕉嵌紋病葉及奎藜單斑病組織超薄切片, 可在細胞質中觀察到風車狀 (pinwheel) 及薄板狀 (laminated aggregates) 內含體。病毒鞘蛋白分子量經電泳及西方轉漬反應分析估算約為32kDa。病毒鞘蛋白經免疫注射白兔後, 可製備得力價達稀釋1024倍之抗血清; 瓊脂免疫雙向擴散反應 (SDS-agar gel double diffusion test) 除能與同源抗原反應外, 另可與菜豆黃化嵌紋病毒 (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) 發生專一性反應。以針對Potyvirus屬病毒鞘蛋白基因之引子對進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR), 美人蕉田間嵌紋病葉及奎藜接種病葉皆可增幅出長度約1263個核苷酸 (nucleotide, nt) 之核酸產物, 其與NCBI GenBank中親緣較近之前12個BYMV序列比對後, 發現與中國報導在美人蕉所分離之菜豆黃化嵌紋病毒 (BYMV) 核苷酸序列之相同度達到93%, 胺基酸序列之相似度亦達93%, 3'端非轉譯區 (3'-NCR) 則有95%之相同度。綜合以上結果顯示本研究自美人蕉所分離之病毒應為BYMV之美人蕉病毒株 (*canna isolate*), 此亦為菜豆黃化嵌紋病毒在台灣美人蕉上發生的首度報導。

關鍵詞: 美人蕉科、馬鈴薯Y病毒屬、菜豆黃化嵌紋病毒

緒 言

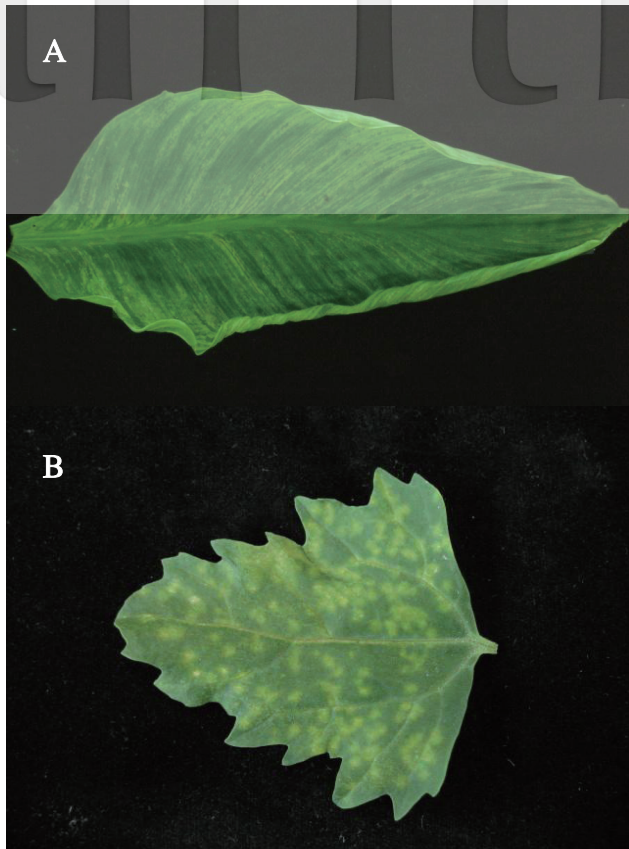
美人蕉 (*Canna* spp.) 屬美人蕉科 (又稱曇華科)

(*Cannaceae*), 英名為Canna, 別名連招花、鳳尾花、小芭蕉、五筋草或破血紅。原產於熱帶亞洲、熱帶美洲、南美洲及非洲等地, 為一年生或多年生之草本植物。美人蕉在分類上屬於單子葉植物亞門、薑目 (*Zingiberales*)、美人蕉科 (*Cannaceae*) 全世界僅一科一屬⁽¹⁰⁾其習性類似薑科和竹芋科。其株高約50-150公分, 地下部為匍匐延伸的根莖, 葉片大, 如芭蕉或香蕉, 呈綠色或紅色, 長約 30-50 公分, 花朵有大花與小花之區分為兩性花。美人蕉採分株或利用種子播種繁殖方式, 喜生長於肥沃濕潤之土壤, 在台灣四季皆可開花, 故為重要之觀賞植物。在1948年Brierley與Smith從具嵌紋病徵之美人蕉葉片上成功分離出一種Potyvirus屬之長絲狀病毒, 並命名為Canna mosaic virus⁽²⁾, 證實與菜豆黃化嵌紋病毒 (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) 為同一種病毒。1956年Castillo等人將有嵌紋病徵之美人蕉葉片汁液機械接種到豆科植物上, 並將發病之豆科植物葉片汁液經電子顯微鏡觀察, 發現有長絲狀病毒存在, 但並未在具嵌紋病徵之美人蕉葉片汁液中發現病毒顆粒⁽³⁾。1977年Gupta與Raychaudhuri在印度發現美人蕉葉受到美人蕉斑駁病毒 (*Canna mottle virus*) 感染時, 葉片伸展會受到抑制, 且在細胞質中的內含體會呈現紡錘狀或盤型⁽⁴⁾。在國內, 1989年鍾氏以健康無帶毒之蕉蚜取食帶有BBTV之香蕉病株, 之後蕉蚜移至美人蕉上做病毒傳播測試, 結果發現病毒可長期存活在美人蕉上, 唯病毒含量極低, 此可證明BBTV可經蕉蚜傳播到美人蕉上, 造成美人蕉之感染⁽¹⁹⁾。本研究室於屏東地區首度發現美人蕉植株葉片出現嵌紋、條斑病徵, 取病葉經電子顯微鏡初步觀察發現有絲狀病毒顆粒, 顯示為一病毒病害。本研究之目的為台灣地區美人蕉病毒病害發生生態、利用傳統及分子技術鑑定病毒及生物學特性測試, 進而做為田間病害發生生態之探討用。

材料與方法

病毒來源及分離

採自屏東地區具有嵌紋病徵之美人蕉病株新葉 (圖一), 以



圖一、美人蕉感染菜豆黃化嵌紋病毒 (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) 葉片的嵌紋病徵 (A) 菜豆黃化嵌紋病毒美人蕉分離株 (BYMV-CA-FT) 接種之奎藜葉片之局部黃斑病徵 (B)。

Fig. 1. Mosaic symptom of a leaf of *Canna* spp. infected by *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) (A). The chlorotic local lesions on a leaf of *Chenopodium quinoa* mechanically inoculated by CA-FT isolate of (BYMV) (B).

5倍量0.01 M pH 7.0磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 研磨成汁液，機械接種於已撒佈金剛砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 葉片上，待葉片出現局部黃色斑點後，再於奎藜上進行3次單斑分離及配合電子顯微鏡觀察，獲得純系病毒分離株CA-FT，保存於-80°C下作為後續研究之病毒源。

寄主範圍測試

取病毒分離株CA-FT機械接種於藜科 (*Chenopodiaceae*)、茄科 (*Solanaceae*)、莧科 (*Amaranthaceae*)、豆科 (*Fabaceae*)、旋花科 (*Convolvulaceae*)、十字花科 (*Cruciferae*)、葫蘆科 (*Cucurbitaceae*) 等17科68種供試植物。置於24°C、12小時光照及12小時黑暗下，連續觀察一個月，並記錄病徵表現情形。接種後之供試植物，不論是否有病徵出現，均以電子顯微鏡觀察其組織粗汁液，並將其回接奎藜上，以確認病毒的感染與否，或有無潛伏感染之現象。

病毒之生體外物理性質測定

取前述CA-FT病毒株之新鮮奎藜病斑，以5倍體積量之0.01 M磷酸緩衝液 (pH7.0) 研磨成汁液，經3,000 rpm離心2分鐘，取上層液，分別進行熱不活化溫度 (thermal inactivation point) 測試的溫度範圍為30、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、99°C、耐稀釋度 (dilution end point) 為10倍系列稀釋為10種不同稀釋倍數 (10^{-1} ~ 10^{-10})、另將上述粗汁液分別置於24°C室溫及-80°C之冷凍櫃，每日定時取置於24°C室溫之粗汁液，機械接種於奎藜上，測定其室溫下耐保存性；每個月定時取出置於-80°C冷凍櫃之粗汁液，退凍後機械接種於奎藜上，測定其耐冷凍保存性。

電子顯微鏡的觀察

取奎藜葉單斑之粗汁液及純化後之病毒懸浮液，滴於覆有formvar並經碳補強之銅網 (copper grid) 上。經2 %醋酸鈾 (uranyl acetate) 染色後，以穿透式電子顯微鏡 (Hitachi, H-7500) 觀察病毒顆粒形態。超薄切片法為取具有嚴重嵌紋病徵之美人蕉病葉、CA-FT病毒株奎藜單斑及健康奎藜組織，以5 % 戊二醛 (glutaraldehyde) 和1 %之四氧化鐵 (osmium tetroxide) 進行前、後固定，再以一系列不同濃度之酒精及100 % 丙酮 (acetone) 進行脫水及Spurr's resin包埋。利用超薄切片機 (Reichert-Jung Ultracut-E) 以玻璃刀 (glass knife) 切片。分別以醋酸鈾 (uranyl acetate) 及檸檬酸鉛 (lead citrate) 進行雙重染色後，於穿透式電子顯微鏡下於穿透式電子顯微鏡下鏡檢受感染細胞之病變⁽¹³⁾。

病毒之純化及抗血清製備

以接種CA-FT病毒分離株之奎藜病葉為純化材料，依前人之研究^(9, 14)之方法加以修改進行本病毒之純化，取鮮重 100 克奎藜病斑加 2倍量 Extracriion buffer (0.25 % Na_2SO_3)，以攪汁機打碎，濾液以各加入病斑鮮重等量的氯仿 (chloroform) 及四氯化碳 (CCl_4) 混合液攪拌 10 分鐘，以 5,000 rpm 離心 3分鐘 (Hitachi R14A rotor) 經三層紗布過濾，吸取上層液，以 8,000 rpm 離心 15分鐘 (Hitachi R14A rotor) 取上層液加0.2 M NaCl 及 6 % PEG, 2 % Triton，於 4°C下低速攪拌 1小時；攪拌後溶液以 10,000 rpm 離心 10 分鐘 取其沉澱物，加入最初材料等倍量的硼酸緩衝液充分懸浮，於 4°C下低速攪拌 30分鐘；攪拌後溶液以 8,000 rpm離心 10分鐘 (Hitachi R14A rotor) 取上層液，以 32,000 rpm 離心 90分鐘 (Hitachi RP 70T rotor)，沉澱物加入 6 ml硼酸緩衝液充分懸浮；懸浮液以 5 ml 38.6%之硫酸鈉 (C_2S_4) 緩緩加入 PET離心管底部，以 39,000 rpm超高速離心 16小時 (Hitachi RPS 40T rotor) 後，所得之白色懸浮物為純化之病毒，之後用針筒 抽取病毒沉降帶並加入等量之硼酸緩衝液 (pH7.0)，以 8,000 rpm 離心10分鐘，取上層液以32,000 rpm，

離心 1 小時 30 分鐘，取沉澱物加硼酸緩衝液懸浮。最後利用分光光度計 (Hitachi U-2001 spectrophotometer) 測讀其波長 320 nm 至 220 nm 紫外光吸光值，並記錄吸光值最高波長 (Amax)/最低波長 (Amin) 及波長 260 nm /280 nm 之比值 (A260/A280)，再依 potyviruses 之吸光係數 (extinction coefficient)=2.4 為定量標準換算純化之病毒收量⁽¹⁴⁾。取 1 ml (1.5 mg/ml) 純化之病毒加入等量之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant, SIGMA) 充分乳化後，經皮下注射到紐西蘭白兔。10 天之後分別再取 1 ml 純化之病毒加入等量之不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant, SIGMA) 充分乳化後，每隔 7 天注射一次，前後共注射四次。所採之兔血在室溫下靜置 2 小時，以 3,000 rpm 離心 10 分鐘 (Hitachi R20A2 rotor)，蒐集上層透明略帶黃色之抗血清，分裝並保存於 -80°C。以環形界面沉澱法 (ring test) 測定抗血清的力價，抗血清以之 0.85% 之生食鹽水內含 5% 甘油作 2 倍系列稀釋至 2048 倍，並以未免疫前之正常兔子血清 (preimmunized normal serum) 作為對照觀察是否有乳白色沉澱物環形界面形成，以判定抗血清之力價 (titer)。

病毒鞘蛋白分子量測定

參考 Laemmli 之方法⁽¹²⁾，將奎藜病葉、健康奎藜及健康美人蕉葉片以 LDS buffer (H₂O 17.5 ml、1.25M Tris-HCl (pH 6.8) 7.0 ml、10% SDS 7.0 ml、 β -mercaptoethanol 1.4 ml、Sucrose 3.5 g) (W/V) 研磨成汁液之後置入微量離心管中，置於恆溫水浴槽，以 100°C 沸水煮沸 3 分鐘後，置於冰桶中冷卻 10 分鐘後進行 SDS-PAGE 電泳分析。

血清學反應

瓊脂雙向擴散反應 (SDS-agar gel double diffusion test)⁽⁵⁾：配製 0.8% Noble agar，趁熱加入 0.5% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 及 1% Na₂S₂O₃，取 10 ml 倒入直徑 9 cm 之塑膠培養皿，凝固後以打孔器打孔，每孔直徑約 5 mm，每孔間距離為 3.5 mm。之後將田間美人蕉嵌紋病葉、從美人蕉分離之 CA-FT 分離株之奎藜病葉，分別與水及 3% SDS 溶液以 1:1:1 (w/v/v) 的比例加以研磨後，於 100°C 沸水悶熱 3 分鐘，接著移至冰浴 10 分鐘。處理完成之樣品，分別置入反應穴中，以進行抗原抗體反應 16 小時；此外另以農業試驗所製備編號 038 之 BYMV 抗血清進行反應，以瞭解相互間之血清學關係。西方轉漬反應⁽⁶⁾ (western blotting) 為將病毒鞘蛋白經 SDS-PAGE 電泳分離後，取下膠體，使用 Bio-Rad mini electroblot cell 裝置，以 100 伏特通電 1 小時，使膠體上之蛋白質轉漬於 PVDF 纖維膜上。取出 PVDF 纖維膜，浸泡於 10 ml 之 TBST buffer 內含稀釋 1000 倍自行製備之分離株抗血清中反應，再以 10 ml TBST buffer 稀釋 6000 倍的山羊抗兔 (goat anti-rabbit) 進行二次抗體反應，最後利用 AP kit (Bio-Rad AP conjugate substrate kit) 作為呈色基質進行呈色，呈色後以蒸餾水沖洗，終止反應並觀察反應結果。

反轉錄聚合連鎖反應 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 與鞘蛋白基因之定序與分析

利用 One-step RT-PCR 進行鞘蛋白基因之選殖，分別取單斑奎藜病葉，美人蕉嵌紋病葉、健康奎藜葉片之組織 0.2 g，於液態氮中研磨成粉。以植物全量 RNA 純化試劑組 (Qiagen Kit, GmbH, Germany) 萃取全量的 RNA。以針對 *Potyvirus* 屬病毒之廣效性引子對，下游引子 Pot1 (5'-AGC TGG ATC CTT TTT TTT TTT TTT-3') 及上游引子 HRP5 (5'-ATG ATH GAR KCN TGG GGG-3')⁽¹³⁾，直接進行 One-step RT-PCR 反應。反應時，於每一 25 μ l 反應體積中分別加入 1 μ l 全量 RNA、12.5 μ l 5x Reaction buffer、1 μ l Pot1、1 μ l HRP5、1 μ l RT-Taq mix 與 8.5 μ l 的二次蒸餾水。充份混合後，於熱循環器 (T3 ThermoCycler, Biometra) 反應。反應條件為先 50°C/30 分鐘、94°C/2 分鐘進行 1 個 RT 循環之後，以 94°C/30 秒、50°C/40 秒、68°C/2 分鐘進行 35 個 PCR 循環；最後於 72°C/5 分鐘，進行 1 個循環。以奎藜單斑為材料所增幅之 RT-PCR 產物進行選殖，將其選殖於 pCR II-TOPO 載體 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)。取 4.5 μ l 之 cDNA 產物加入 0.5 μ l 載體 使總體積為 5 μ l，置室溫下 5 分鐘以進行粘合反應 (ligation) 之後，置於冰浴中 3 分鐘，再加入 50 μ l TOPO 10F' competent cells (*E. coli* strain TOPO 10F, Invitrogen Crop., Carlsbad, CA, USA)，置於冰浴中 15 分鐘，而後於 42°C 經 45 秒進行轉型 (transformation)，冰浴 5 分鐘，加 250 μ l LB 液體培養基於 37°C 振盪 1 小時後，取 100 μ l competent cell (*E. coli* strain TOPO 10F)，再加 2% X-gel 30 μ l，100 mM IPTG 30 μ l，塗於含 kanamycin 之 LB 培養基中，於 37°C 培養 16 小時。核酸序列之定序與分析，是使用一組引子利用 Primer extension 方式做同向及反向譯讀解序，此乃根據 Sanger *et al.* (1977)⁽¹⁷⁾ 之雙股去氧核糖核酸鏈終止方法 (dideoxy chain termination)，將所篩選之選殖株送交明欣生物技術公司進行核苷酸序列分析。解序所得資料以 Vector NTI Suite (InforMax, INC. Wesconsin, USA) 進行分析比對，再與 NCBI 網站上之已知 potyviruses 序列比對，分析不同病毒的鞘蛋白基因間核苷酸序列、胺基酸序列和 3' 末端非轉譯區 (3'-NCR) 的差異性，並進一步計算出彼此間之相同度。

結 果

病毒之分離

將具有嚴重嵌紋病徵之美人蕉病株新葉之粗汁液，機械接種於奎藜葉片上，接種後 5-7 天於奎藜上出現局部黃斑的病徵 (圖一)。取單斑進行 3 次單斑分離後，即可得一分離之病毒株，標號為 CA-FT。

寄主範圍測試

將 CA-FT 病毒分離株接種於 17 科 68 種供試植物，僅奎藜、紅藜及綠藜等三種藜科植物被感染，葉部呈現局部斑點病徵。

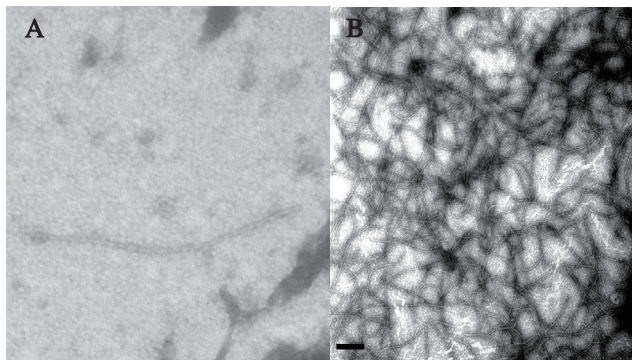
電顯檢查接種所產生之病斑組織粗汁液，皆可觀察到長絲狀病毒顆粒。其餘供試植物之接種葉或新葉上皆無局部或系統性病徵，使用其組織粗汁液進行機械接種亦無法成功地回接至奎藜上產生感染，且電顯觀察亦未發現病毒顆粒之存在。

病毒之生體外物理性質測定

病毒之熱不活化溫度為 55°C 、耐稀釋度為 10^4 、於室溫下(24°C)病毒活性僅能維持1天、而在冷凍保存 -80°C 時，可維持活性至少達6個月。

電子顯微鏡的觀察

奎藜單斑組織液及純化病毒之負染樣本以穿透式電子顯微鏡觀察，可見到一種絲狀病毒顆粒，長度介於 $750\text{-}830\text{ nm}$ 之間(圖二)。CA-FT分離株奎藜單斑組織之超薄切片法在電顯下觀察，可見到受感染之細胞內部發生病變，奎藜葉細胞內之葉綠體扭曲、變形，在細胞質中觀察到風車狀(pinwheel)及美人蕉病葉組織切片在細胞質中觀察到風車狀(pinwheel)及薄板狀(la)內含體(圖三)。

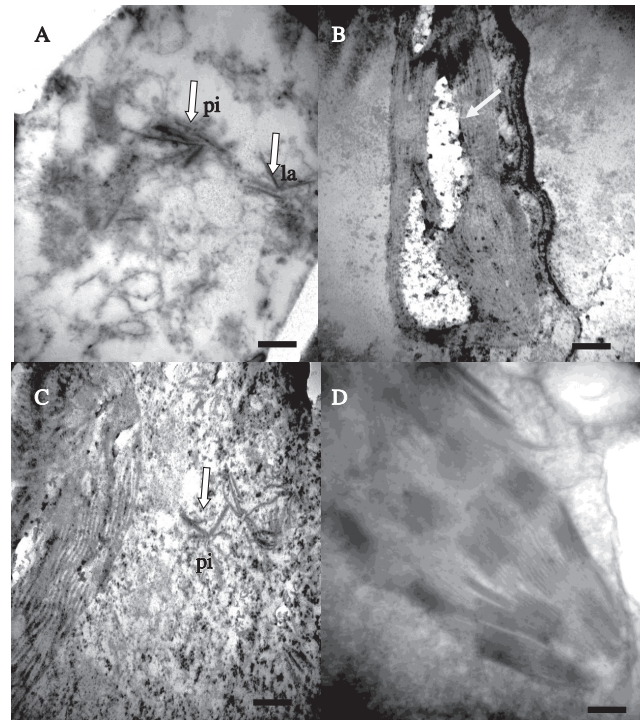


圖二、美人蕉嵌紋病相關的病毒顆粒之負染電顯圖。(A) 美人蕉病葉粗汁液中之病毒顆粒；(B) 由奎藜葉片純化之病毒顆粒。

Fig. 2. Electron micrographs of negatively stained virus particles extracted from canna leaf with mosaic symptom (A) and the purified virus particles prepared from infected leaves of *Chenopodium quinoa* (B).

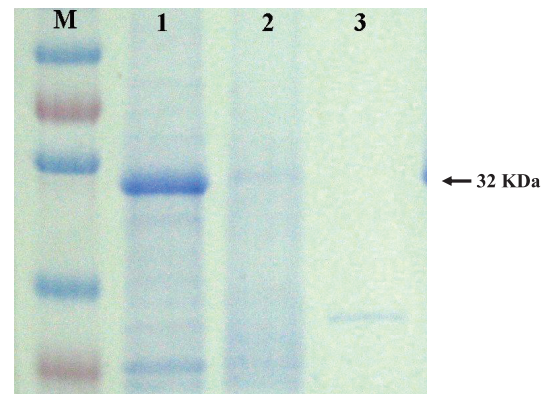
病毒之純化與抗血清之製備

奎藜單斑病葉鮮重100克，經純化後之樣本，於電顯觀察可見到大量長絲狀病毒顆粒。以分光光度計(Hitachi U-2001 spectrophotometer)測讀其純化樣本懸浮液之波長 320 nm 至 220 nm 紫外光吸光圖譜，顯示為其典型核蛋白，其 A_{max} 在 258 nm ， A_{min} 在 238 nm ， $A_{\text{max}}/A_{\text{min}}$ 比值為1.1， A_{260}/A_{280} 之比值為1.24。以potyvirus之吸光係數(extinction coefficient) $=2.4$ 為定量標準，換算純化之病毒濃度為 2.6 mg/ml ，每 100 g 鮮重之奎藜葉片所得之純化病毒收量約為 1.2 mg 。以純化病毒為抗原，免疫注射後，由實驗動物採得之抗血清以界面環形沉澱法進行抗體力價測試，結果顯示抗體力價可達1024倍。



圖三、菜豆黃化嵌紋病毒於美人蕉嵌紋病葉及接種奎藜之單斑病葉超薄切片電顯圖。(A)美人蕉病葉細胞質中之風車狀(pi)及薄板狀(la)內含體；(B & C)分別為受感染奎藜葉片之葉綠體和細胞質中的風車狀(pi)內含體；(D)健康奎藜葉片細胞。

Fig. 3. Ultrathin section electron micrographs of Bean yellow mosaic virus (BYMV) isolated from canna infected *Chenopodium quinoa* leaf. (A) pinwheels (pi); laminated aggregates (la) in cytoplasm. (B) Distorted and transfigured grana and lamella in the chloroplast(ch). (C) pinwheels (pi) in cytoplasm (D) Chloroplast of healthy *C. quinoa*. Bar=640 nm.



圖四、應用聚丙烯酰胺凝膠電泳估量由美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒之鞘蛋白分子量。行M 標記蛋白；行1，美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株奎藜病葉；行2，健康奎藜；行3，健康美人蕉。

Fig. 4. The determination of molecular weight of viral coat proteins of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) isolated from canna by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Lane M, Protein markers; lane 1, *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) isolate on the inoculated leaf of *C. quinoa*.; lane 2, healthy *C. quinoa*.; lane 3, healthy canna.

病毒鞘蛋白分子量測定

CA-FT病毒經SDS-PAGE電泳分析其病毒鞘蛋白，與標記蛋白做比對，估算得知病毒鞘蛋白分子量約為32 kDa (圖四)。

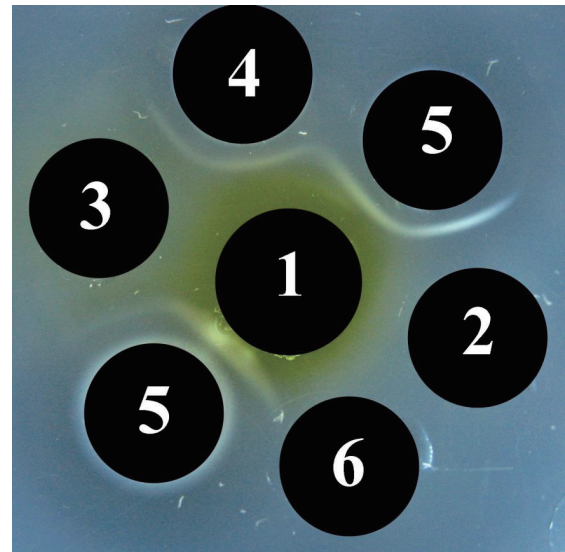
血清學反應

以所製備之抗血清與接種從美人蕉分離之CA-FT分離株之奎藜單斑病葉粗汁液、田間美人蕉嵌紋病葉與條斑病葉之粗汁液、純化病毒懸浮液(同源抗原，正對照)、健康奎藜組織粗汁液進行瓊脂雙向擴散反應。16小時後之結果顯示，本研究製備之抗血清與CA-FT分離株奎藜單斑病葉粗汁液、田間美人蕉嵌紋葉片及正對照抗原，皆呈現同源正反應；但與健康奎藜組織粗汁液則無反應(圖五)。另BYMV抗血清與上述樣品反應，亦會發生特異性沉澱反應，異源之農業試驗所製備之BYMV抗血清(編號038)與CA-FT分離抗血清產生融合反應(圖六)。西方轉漬反應結果呈現純化病毒、奎藜單斑病葉組織粗汁液與田間美人蕉嵌紋病葉組織粗汁液等樣本均可與自製之CA-FT分離株抗血清及BYMV抗血清反應，並以AP substrate kit 進行呈色，結果顯示純化病毒、CA-FT分離株之奎藜病葉與田間美人蕉嵌紋病葉，皆可與上述兩種抗血清發生明顯之正反應，於32 kDa呈現紫色反應條帶(圖七)。



圖五、美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株抗血清與其對應同源抗原之瓊脂雙向擴散反應。(1) 美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株單斑奎藜、(2) 健康奎藜、(3) 美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株純化病毒、(4-5) 田間美人蕉嵌紋葉片、(6) 蒸餾水、(7) 美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株抗血清。

Fig. 5. The serological reaction of the produced antiserum against *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) isolated from canna reacted with the homologous antigen in double immunodiffusion. (1) *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) isolated inoculated leaf of *C. quinoa*; (2) Healthy *C. quinoa*; (3) The purified *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) isolated; (4-5) The field mosaic canna leaf; (6) Dist H₂O; (7) *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) antiserum to virus isolated from canna.

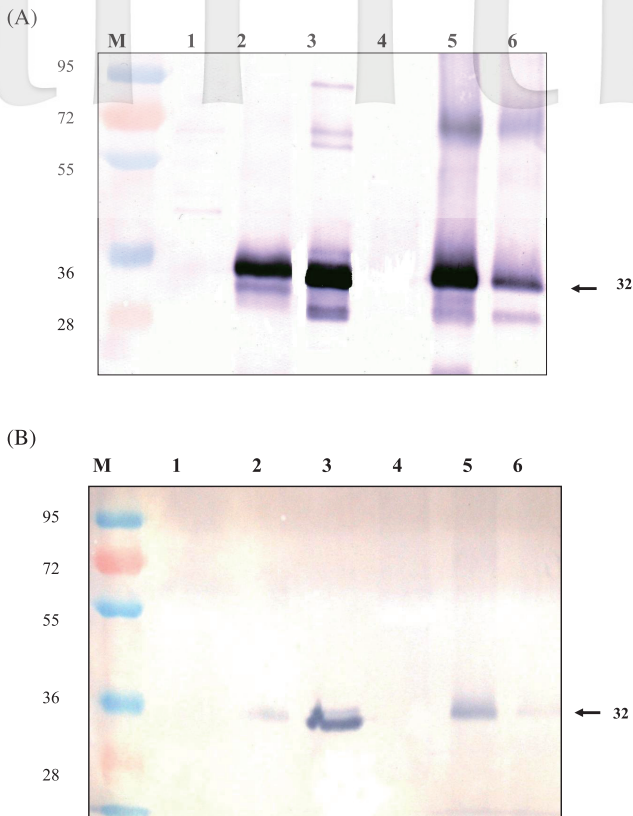


圖六、菜豆黃化嵌紋病毒抗血清與其對應同源抗原之瓊脂雙向擴散反應。(1)CA-FT分離株單斑奎藜、(2)美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株純化病毒、(3)農試所038 *Bean yellow mosaic virus* 正對照、(4)農試所038 *Bean yellow mosaic virus* 抗血清、(5)美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株抗血清、(6)蒸餾水。

Fig. 6. The serological reaction of the produced antiserum against BYMV virus isolate reacted with the homologous antigen in double immunodiffusion. (1) Bean yellow mosaic virus (BYMV) isolate inoculated leaf of *C. quinoa*; (2) The purified Bean yellow mosaic virus (BYMV) isolated from canna; (3) No.038 *Bean yellow mosaic virus*; (4) No.038 antiserum to *Bean yellow mosaic virus*; (5) antiserum to Bean yellow mosaic virus (BYMV) isolate from Canna; (6) Dist H₂O.

反轉錄聚合 連鎖反應 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 與鞘蛋白基因之定序與分析

利用 *Potvirus* 屬病毒鞘蛋白基因之廣效性引子對HRP5/Pot1，分別對單斑奎藜病葉、田間美人蕉嵌紋病葉和健康奎藜葉片之全量RNA，進行RT-PCR。反應結果顯示除健康奎藜外，可自奎藜病葉、美人蕉田間嵌紋病葉增幅出預期長度約1300 bp之核酸產物(圖八)。DNA片段經選殖及核苷酸序列分析之後，共解得全長含1263個核苷酸(nucleotide, nt)之序列。經分析比對後證實此序列符合 *Potvirus* 屬病毒3'端基因體之典型架構，由5'端起序列分別含246 nt之細胞核內含體(nucleotide inclusion b, NIB)基因之3'部分序列，822 nt之全長度鞘蛋白(coat protein, CP)基因與一個171 nt之3'端非轉譯區(3' non-coding region, 3'-NCR)，其全長核苷酸對應轉譯蛋白質可產生355個胺基酸。本研究美人蕉嵌紋病毒株CA-FT之HRP5-pot1選殖株經由核苷酸解序後，至NCBI網站上與國內外已登錄於GenBank之前12個親緣關係較近之BYMV進行鞘蛋白序列比對，發現其核苷酸序列與中國大陸在美人蕉上所分離出的BYMV有93%之相同度為最高，胺基酸序列則有93%之相似度，3'端非轉譯區(3'-NCR)則有95%之相同度(表一)。

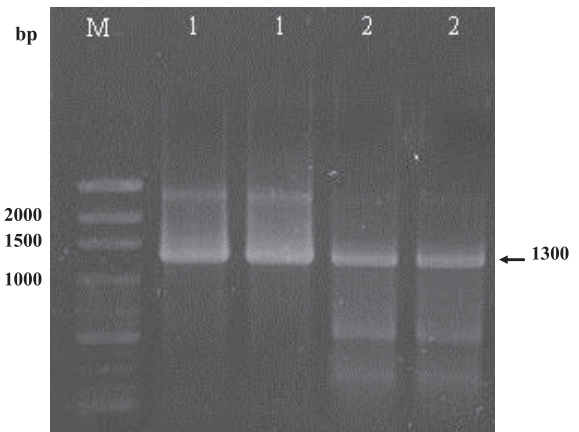


圖七、美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株抗血清 (A) 與農試所編號038 *Bean yellow mosaic virus* 抗血清 (B) 之西方轉漬反應。行 M, 標記蛋白；行1, 健康奎藜；行2, 美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株奎藜病葉；行3, 美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒分離株純化病毒；行4, 健康美人蕉；行5 & 6, 田間美人蕉嵌紋病葉。

Fig. 7. Western blotting assay of *Bean yellow mosaic virus*. isolate from canna with antiserum to *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) isolated from canna (A) and No. 038 antiserum to *Bean yellow mosaic virus* (B). Lane M, Protein marker; lane 1, healthy *C. quinoa*; lane 2, CA-FT isolate inoculated leaf of *C. quinoa*; lane 3, The purified CA-FT virus; lane 4, healthy canna; lane 5 & 6, field mosaic canna leaf.

討 論

本研究自呈現嵌紋病徵之美人蕉植株葉片上分離出一種長度約為750-830 nm的長絲狀病毒，其病毒熱不活化溫度為55°C、耐稀釋度為 10^{-4} 、室溫(24°C)下活性僅可維持約1天，冷凍(-80°C)可保存6個月，物理性質之結果與ICTV上所公佈之BYMV物理性質及寄主範圍等部分有差異，推測可能由不同寄主上所分離到的病毒株不同，因而會有其特性之不同之結果。進行CA-FT病毒株之寄主範圍，測試17科68種供試植物，CA-FT僅能感染奎藜、紅藜及綠藜等3種藜科植物造成局部性斑點，並未發現系統性感染，顯示其寄主範圍非常窄，推測亦應與病原病毒長期存於以無性繁殖之美人蕉植株內進行有效傳播有關。



圖八、利用對應potyviruses之廣效性引子對 (HRP5/ Pot1) 進行菜豆黃化嵌紋病毒-美人蕉分離株RT-PCR分析。增幅出約1300 bp之DNA產物，行M, 標準DNA標記；行1, 單斑奎藜病葉；行2, 田間美人蕉嵌紋病葉。

Fig. 8. One step reverse-transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) using a pair of potyviruses-specific degenerate primer (HRP5/ Pot1) to react with *Bean yellow mosaic virus*. isolate from canna a predict 1300-bp DNA product was amplified. Lane M, DNA markers; lane 1. *Bean yellow mosaic virus* isolate from canna isolate inoculated leaf of *C. quinoa*; lane2, mosaic leaf of canna collected from field.

表一、由美人蕉分離之菜豆黃化嵌紋病毒(*Bean yellow mosaic virus*, BYMV)與已發表之BYMV鞘蛋白基因序列相同度之比較

TABLE 1. Comparison of nucleotide and amino acid sequence identities of the CP gene of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) isolated from canna to that of some BYMV isolates.

IBYMV (Accession. NO.)	Source		Identity (%)		
			CP	aa	3'-NCR
	country	host	nt	aa	nt
DQ060521	China	Canna	93	93	95
EF592168	China	Canna	94	94	94
EF592169	China	Canna	93	93	93
EU144223	USA	Lupin	85	90	94
AY845012	India	Vanilla	85	88	94
AY845011	India	Vanilla	85	88	94
X63358	Netherlands	—	85	89	94
AB079782	Japan	Gentiana plant	85	90	94
AB079886	Japan	—	85	89	93
AJ311371	China	Vegetable	85	89	93
AB097090	Japan	Gentiana plant	85	90	94
AB097089	Japan	Gentiana plant	85	89	94

Edwardson報導potyviruses危害寄主後，會在其細胞中誘導形成風車狀 (pinwheels)、卷軸狀 (scrolls) 及薄板狀 (laminated aggregates) 等特殊構造內含體，可作為診斷鑑定之重要依據⁽⁶⁾。而本研究以電顯觀察受病毒感染之奎藜單斑及田間嵌紋病徵美人蕉病組織切片，皆可在細胞中觀察到Edwardson分類法中subdivisions II的風車狀 (pinwheel) 及薄板狀 (laminated

aggregates) 內含體，也顯示此美人蕉CA-FT病毒株，應屬 potyvirus。這些性質皆與potyviruses之基本生物特性相符⁽¹⁵⁾，由病毒形態，基本生物特性及細胞學證據，鑑定本研究分離之CA-FT病毒應屬Potyviridae科病毒之成員之一。

病毒感染植物通常會造成寄生組織與細胞在構造上與功能發生改變及干擾，導致寄主產生黃化、嵌紋、矮化、畸形等各種病徵⁽¹⁵⁾，其中尤以參與光合作用之葉綠體病變破壞而致阻礙植物光合作用之進行，進而阻礙葉綠素的合成，使病葉產生嵌紋病徵最為常見。本研究電顯觀察美人蕉病組織切片，發現葉綠體病變，葉綠餅 (grana) 及板層 (lamella) 內充滿結晶物 (crystal) 內含體，此結晶物 (crystal) 內含體可在被potyvirus感染的細胞中觀察到，以上病理組織所觀察到的葉綠體與正常細胞葉綠體構造明顯不同，推測此應為造成美人蕉黃化嵌紋病徵之重要原因之一。

純化後之病毒A260/A280之比值為1.74，符合0.77-2.9之 potyvirus比值範圍，且純化病毒之鞘蛋白經SDS-PAGE電泳膠體分析可於32 kDa的位置見到一條條帶，符合一般potyvirus之鞘蛋白分子量為30-47 kDa。以其他不同嵌紋病徵之美人蕉葉片進行偵測時，亦發現有不與CA-FT分離株抗血清發生反應者，但若將此種嵌紋葉片置於電顯下可觀察到約750 nm之絲狀病毒顆粒。絲狀病毒在美人蕉上之報導，除了BYMV之外，還有在2007年由Monger等⁽¹⁶⁾所報告的*Canna yellow streak virus*，其屬於potyvirus，長度約783 nm，感染美人蕉引起黃化條斑病徵。因此，是否為此病毒亦或是另一新病毒所造成之危害則待日後更進一步之研究。

本試驗為瞭解CA-FT分離株之血清關係，利用瓊脂雙向擴散法測試其免疫擴散反應，結果發現無論是純化病毒、感染CA-FT分離株之奎黎病株，皆能與BYMV抗血清發生同源性的沉澱反應，此更進一步確定所分離之病毒即為BYMV。

除傳統病毒生物性質研究比較外，利用病毒間鞘蛋白片段之胺基酸、核苷酸及3'端非轉譯區 (3' non-coding region, 3'-NCR) 之序列相同度比對更可將potyvirus迅速正確地鑑定到種 (species)，乃現代分類上相當強而有力的指標^(11, 18)。本研究美人蕉CA-FT病毒株之HRP5-pot1 選殖株經選殖及核苷酸序列分析之後，共解得全長含個1263核苷酸 (nucleotide, nt) 之序列，與NCBI網站上查詢國內外報告中61個已登錄於GenBank之前12個親緣關係較近之BYMV進行鞘蛋白序列比對，分析不同病毒間核苷酸序列、胺基酸序列及3'末端非轉譯區 (3'-NCR) 的差異性，發現其核苷酸序列與中國大陸美人蕉 (accession number DQ060521.1) 上之BYMV有93%之相同度為最高，胺基酸序列則有93%之相同度，依據國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 分類，分離株鞘蛋白核苷酸序列介於76-77 %及胺基酸序列80% 相似度為相同種，因此依鞘蛋白基因序列的比對結果顯示，本研究之美人蕉嵌紋病毒分離株應為BYMV。綜合上述病毒形態大小、基本物理特

性、細胞病理學、血清學反應及核酸序列比對等種種證據，一致顯示本研究分離出之病毒應為BYMV，此為台灣地區首次由美人蕉病株分離出絲狀病毒之新記錄。

引用文獻

1. Barnett, O. W., Randles, J. W., and Burrows, P. M. 1987. Relationships among Australian and North American isolates of the bean yellow mosaic potyvirus subgroup. *Phytopathology* 77(6):791-799.
2. Brierley, P., and Smith, F. F. 1948. Canna mosaic in the United States. *Phytopathology* 38 : 230-234.
3. Castillo, B. S., Yarwood, C. E., and Gold, A. H. 1965. Canna mosaic virus. *Plant Dis. Repr.* 40:169-172.
4. Datta-Gupta, M. D., and Raychaudhuri, S. P. 1977. Purification, electron microscopy and serology of Canna mottle virus infection. *Acta. Bot. Indica.* 5:189-192.
5. Dijkstra, J., and de Jager, C. P. 1998. Gel Double-Diffusion Test in Plates. In: *Practice plant Virology. Springer Lab Manual.* p341-347. Springer, Berli, Heidelberg.
6. Edwardson, J. R. 1992. Inclusion bodies. *Arch. Virol. (Suppl.)* 5:25-30.
7. Gibson, O. E. M., Heid, C. A., and Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR-Genome Res 6:985-1001.
8. Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein blotting-PR165-178. In *Methods in Molecular Vol.1. protein.*
9. Hseu, S. H., Huang, C. H., and Chang, C. A. 1987. Bean yellow mosaic virus from gladiolus: Identification, purification and its serological properties. *Agric. Res. China.* 36(1):94-104. (in Chinese)
10. Huang, T. C. 2006. *Plant Taxonomy-Families of Taiwan vascular.* p444.
11. Inoue-Nagata, A. K., Fonseca, M. E., Resende, R. O., Boiteix, L. S., Monte, D. C., Dusi, A. N., de Avila, A. C., and van der Vlugt, R. A. 2002. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweet pepper, *capsicum annum*. *Arch. Virol.* 147(4):849-855.
12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
13. Liao, J. Y., Chang, C. A., Lai, R. S., Deng, T. C. 2004. Identification of Peanut strip virus infecting *Uraria crinita*. *Plant Prot. Bul.* 46:379-390. (in Chinese)
14. Lin, Y. Y. 2003. Characterization of A New Potyvirus Isolated from Jasmin (*Jasminum sambac* (L.) Ait) (in Chinese)

15. Matthews, R. E. F. 2002. Plant virology. Academic press, New York. 1001pp.
16. Monger, W. A., Harju, V., Skelton, A., Seal, S. E., and Mumford, R. A. 2007. *Canna yellow streak virus*: a new potyvirus associated with severe streaking symptoms in Canna. Arch. Virol. 152 (8): 1527-1530.
17. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain - terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74(12):5463-5467.
18. Shukla, D. D. Ward, C. W., and Brunt, A.A.1994. The Potyviride. CAB international. p516. Cambridge.
19. Zhong, Y.1989. Ecological studies on banana bunchy top virus: virus strains, intermediate hosts and vectorship. (in Chinese).

was 93%. Based on these results, the virus CA-FT isolated from canna with mosaic symptom should be a strain of BYMV. This is a new record of BYMV infecting canna in Taiwan.

Keywords: Canna, *Bean yellow mosaic virus*, potyvirus

ABSTRACT

Lo, Y.-C, Chen, T.-H.* , Chang, C. A., and Tzeng, J. 2018. Characterization of an isolate of *Bean yellow mosaic virus* associated with canna mosaic in Taiwan. J. Plant Med. 60(2): 23-30.
*Corresponding author, T.-H. Chen, E-mail: thchen@mail.npust.edu.tw

Canna (*Canna* spp.) is an annual ornamental plant. A filamentous virus of about 750-830 nm in particle size, was successfully isolated from mosaic canna plant by mechanical inoculation in Pingtung, and was temporarily named as CA-FT. The thermal inactivation point was 55°C, dilution end point was 10⁻⁴ and the longevity in vitro was 1 day at 24°C and more than 6 month at -800C .The host range test indicated that CA-FT is a virus with very narrow host range and only infected 3 out of 68 species of plants tested. Inclusion bodies of pinwheel and Laminated aggregates, an indication of typical potyvirus infection, were found in cells of infected *Chenopodium quinoa* and canna. SDS-PAGE showed the virus coat protein contains a subunit with relative molecular weight of about 32 kDa. An antiserum with a titer of 1024 was prepared by immunizing a white rabbit with the purified virions. The antiserum produced can be effectively applied to detect studied virus . The antiserum produced reacted strongly with homologous antigen and with *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), indicating the serological relatedness between the studied canna virus and BYMV. A cDNA fragment, consists of partial N1b, full CP, and 3'NCR of the virus, was amplified with RT-PCR and was cloned. The sequence of the 1263-nt cDNA fragment was found to be corresponding to a canna-infecting BYMV isolate in China. The sequence identities of the CP gene and the 3'-non coding regions (3'-NCR) of both viruses were 93% and 95%, respectively, while that of CP amino acid sequence