

感染沙漠玫瑰的緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*) 之鑑定與檢測

林羿廷¹ 蔡錦慧¹ 林玫珠² 鄧汀欽^{3,*}

摘要

林羿廷、蔡錦慧、林玫珠、鄧汀欽。2020。感染沙漠玫瑰的緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*) 之鑑定與檢測。台灣農業研究 69(1):77–89。

2013 年高雄「大紅花」沙漠玫瑰，疑似病毒感染，經單斑接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.)，分離得到一個病毒純系的分離株 DR-TW。經免疫分析顯示此分離株與雞蛋花嵌紋病毒 (*Frangipani mosaic virus*; FrMV) 及番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*; ToMV) 等菸草嵌紋病毒屬 (*Tobamovirus*) 的病毒抗體有交互反應。汁液接種番杏、紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn) 、奎藜、綠藜 (*Chenopodium murale* L.)、千日紅 (*Gomphrena globosa* L.) 及曼陀羅後都呈局部病斑，菸草、雞蛋花及沙漠玫瑰植株則形成系統性嵌紋，但對辣椒、番茄等茄科植物的病原性及致病力均弱於 ToMV。以菸草嵌紋病毒屬廣效性引子對 TobRT up1/TobRT do2 進行反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，增幅出 568 bp 的核酸片段。經定序後與 GenBank 中的核苷酸序列進行比對，結果顯示沙漠玫瑰台灣分離株 (DR-TW) 與緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*; PluMV) 的相同度高達 98%。進行 DR-TW 基因體定序，得核苷酸全長 6,683 bp (GenBank accession number KX881422)，共轉錄出 188.3 kDa 及 130.4 kDa 的複製酶、28.7 kDa 的移動蛋白及 19.0 kDa 的鞘蛋白。設計 PluMV 專一性引子對 (PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw)，經 RT-PCR 可增幅出 PluMV 的核酸片段 643 bp，其他 8 個供試菸草嵌紋病毒屬病毒則無。配合 FrMV 專一性引子對 FrMVcp-up/FrMVcp-dw，以 RT-PCR 即可鑑別 FrMV 及 PluMV。

關鍵詞：台灣、分離株、菸草嵌紋病毒屬、雞蛋花嵌紋病毒。

前言

沙漠玫瑰 (desert rose) 學名 *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult. 屬於龍膽目 (Gentianales) 夾竹桃科 (Apocynaceae) 天寶花屬 (*Adenium*) 多年生肉質灌木，原產於非洲沙漠地區，具強韌的生命力，花色如紅玫瑰，故得名。沙漠玫瑰在盛夏開花，其花形與花色艷麗，1968 年引進台灣後，園藝育成的多樣化品種加上盆栽藝術，沙漠玫瑰已成為觀賞植物之一，目前育

種栽培及種苗外銷在台灣中南部都有商業模式的經營生產。

沙漠玫瑰繁殖方式主要採用種子生產實生苗，但利用壓條或扦插亦可無性繁殖。由於栽培過程中頻繁的嫁接或盆栽雕塑，使沙漠玫瑰感染病毒的現象日漸普遍。台灣已有胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 感染沙漠玫瑰的紀錄 (Chen *et al.* 2012)，本研究從沙漠玫瑰另外分離出一種新的病毒，初步鑑定屬於菸草嵌紋病毒屬 (*Tobamovirus*) (Deng *et al.*

投稿日期：2019 年 8 月 20 日；接受日期：2019 年 10 月 25 日。

* 通訊作者：tcde@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

2015)，進一步經抗體反應、全核酸解序及親緣分析，鑑定為緬梔嵌紋病毒。本研究部分原始資料已在 2017 年度植物病理學會年會論文宣讀中發表 (Lin *et al.* 2018)。

材料與方法

病毒來源及分離

2013 年 10 月自高雄橋頭採得「大紅花」沙漠玫瑰樣本，其葉片皺縮，呈黃綠嵌紋疑似病毒感染之病徵 (圖 1A)。以 10× 量 (W/V) 之 0.1 M, pH 7.1 磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 研磨葉片，取粗汁液以磨擦方式接種於撒布金鋼砂的供試植株葉片，包括紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn)、綠藜 (*Chenopodium murale* L.)、奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.)、千日紅 (*Gomphrena globosa* L.) 及圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana* L.) 等指示植物。在奎藜接種葉形成局部病斑 (圖 1B)，經 3 次單斑接種，分離得到一個病毒純系，稱為沙漠玫瑰台灣分離株 (DR-TW)。定期接種奎藜，更新保存於防蟲網室，為以下鑑定試驗的病毒來源。

寄主範圍試驗

以 DR-TW 作為供試病毒，以上述接種方法，接種 8 科 25 種 (表 1) 植物的實生苗，包括回接沙漠玫瑰等。每日觀察並記錄接種葉及新葉的病徵，於網室中觀察至少 1 mo，最後以酶聯抗體免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 或 RT-PCR 確認感染情形。

ELISA

供試檢測抗原及抗體為實驗室先前所製備保存，病毒種包括 *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV) (Deng *et al.* 2011)、菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*; TMV) (Liao *et al.* 2007)、ToMV (Deng *et al.* 2012) 及山葵斑駁病毒 (*Wasabi mottle virus*; WMoV) (Deng *et al.* 2016)。市售免疫檢測試劑組針對 *Tobamovirus* 所屬病毒種 FrMV、*Maracuja mosaic virus* (MarMV)、*Pepper mild mottle virus* (PMMoV)、*Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) 均購自 AC Diagnostics Inc. (Fayetteville, AR, USA)。

免疫球蛋白 (immunoglobulin G; IgG) 純化及 ELISA 沿襲 Clark & Adams (1977) 的方法。ELISA-供試檢體 (葉片) 以等量 coating buffer 混合取液，經間接法 ELISA (Koenig 1981)，最後測定微量盤中各穴的樣品在 405 nm 之吸收值 (A405nm)。

西方墨漬法 (Western blot)

供試檢測抗原為前述病毒，抗體為 ToMV 及 tobamovirus 廣效性多元抗血清 (Chou *et al.* 2018)。依據 Towbin *et al.* (1979) 的方法，將供試檢體以含有 1% SDS 的 12% polyacrylamide 進行膠體電泳 (SDS-PAGE) 後，將蛋白轉漬於 0.45 μm 硝化纖維紙 (nitrocellulose paper)，再與上述各種抗體反應，然後加入以鹼性磷酸酶標定之山羊抗兔免疫球蛋白 (Sigma A3687)。反應後，以基質 nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) 及 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt (BCIP) 呈色。

RT-PCR

取 100 mg 病株葉肉組織利用全量 RNA 純化試劑組 (Plant Total RNA Extraction Miniprep System; Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 萃取 RNA。以病毒 total RNA 為模板，應用 *Tobamovirus* 屬廣效性引子對 TMVmpf (5'-AGTTGTTGATGAGTTCATGGA-3') 及 TMV3nr (5'-CAAC-CCTTCGATTTAAGTGGA-3') (Huang *et al.* 2004) 與 TobRT up1 (5'-GARTAYSCIGCIYTCARAC-3') 及 TobRT do2 (5'-BGCYTCRAARTTCCA-3') (Dovas *et al.* 2004) 進行 RT-PCR，取 2 μL RNA、1 μL Forward primer (10 μM)、1 μL Reverse primer (10 μM) 及 16 μL DEPC-water，加入 AccuPower RT-PCR Premix tube (Bioneer, Daejeon, Korea) 中混合均勻，將反應液置於 Biometra FlexCycler2 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) 中進行增幅。RT 反應條件如下，先於 95°C 反應 5 min，4°C 反應 15 min，42°C 反應 60 min，95°C 反應 15 min，之後再進行 35 個循環 PCR 反應 95°C 30 s，55°C 或 44°C 30 s，70°C 60 s，最後再進行 70°C 10 min。RT-PCR 產物以 1.2% agarose 進行電泳分析，預期片段分別為約 800 bp 或 568 bp 之核苷酸片段。

病毒核酸定序與親緣分析

將上述 DR-TW 所增幅之核酸片段，應用 yT&A 載體及 ECOS101 勝任細胞 (Yeastern

Biotech, Taipei, Taiwan) 進行選殖後，委由明欣生物科技公司 (台灣台北市) 進行核苷酸定序分析。所得之 DR-TW 的序列與 GenBank 上登

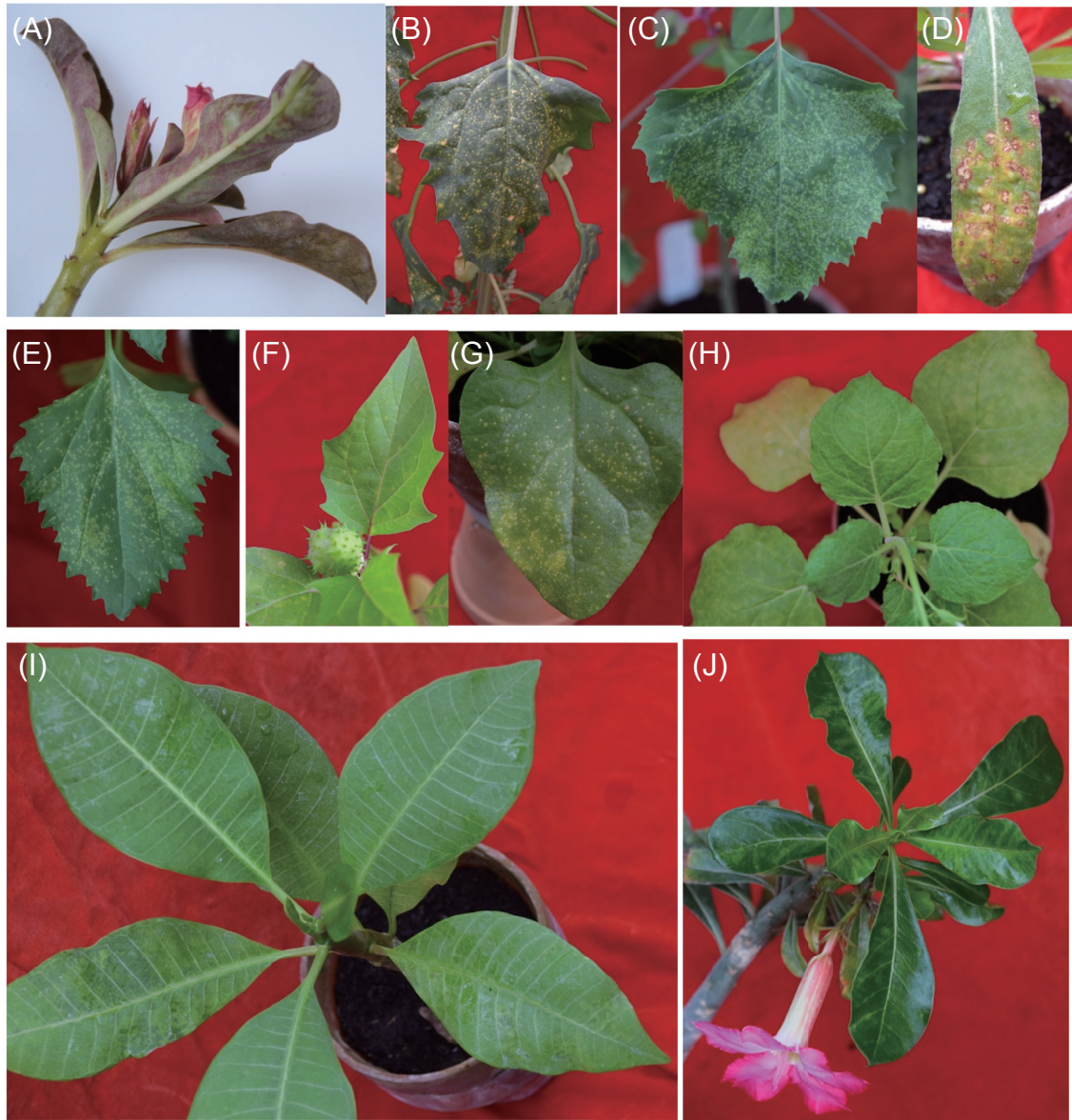


圖 1. (A)「大紅花」沙漠玫瑰疑似病毒感染的病徵。接種沙漠玫瑰病毒分離株 (DR-TW)，葉片出現局部病斑；(B) 奎藜、(C) 紅藜、(D) 千日紅、(E) 綠藜、(F) 曼陀羅及 (G) 番杏；局部病斑以外也出現系統性嵌紋病徵：(H) 圓葉菸草、(I) 雞蛋花及 (J) 沙漠玫瑰。

Fig.1. (A) Desert rose 'Da-hong-hua' with virus-like symptoms. By inoculation of virus isolate 'DR-TW', local lesions developed on leaves of (B) *Chenopodium quinoa*, (C) *Chenopodium amaranticolor*, (D) *Gomphrena globosa*, (E) *Chenopodium murale*, (F) *Datura stramonium* and (G) *Tetragonia tetragonioides*, and systemic mosaic showed on plants of (H) *Nicotiana benthamiana*, (I) *Plumeria rubra* and (J) *Adenium obesum*.

錄之核苷酸序列進行比對，並利用 MegAlign Pro (Lasergene 13; DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) 中的 Clustal Omega 對鞘蛋白之核苷酸序列及胺基酸序列進行 alignment 後，再以 MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>) 之 Neighborhood-joining 將全基因的核苷酸序

列繪製親緣關係樹狀圖 (Bootstrap 分析 1,000 次)。

全長度基因體核苷酸序列定序分析

先以 Random hexamer/oligoDT21 引子對進行 cDNA 的合成，依據 CP 基因的核苷酸序列

表 1. 沙漠玫瑰分離株 (DR-TW) 接種試驗的寄主範圍與病徵表現。

Table 1. Experimental host range and symptoms induced by inoculation of virus isolate 'DR-TW'.

Family	Species	Symptom ^z
Acanthaceae	<i>Dicliptera chinensis</i> (L.) Juss.	-/-
Aizoaceae	<i>Tetragonia tetragonioides</i> (Pall.) O. Kuntze	NL/-
Amaranthaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn.	CL/-
	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	CL/-
	<i>Chenopodium murale</i> L.	CL/-
	<i>Gomphrena globosa</i> L.	NL/-
Apocynaceae	<i>Adenium obesum</i> (Forssk.) Roem. & Schult	-/M
	<i>Plumeria rubra</i> L.	-/M
Brassicaceae	<i>Brassica rapa</i> L.	-/-
	<i>Brassica campestris</i> L. ssp. <i>Chinensis</i> L. Makino	-/-
Cucurbitaceae	<i>Cucumis melo</i> L.	-/-
Fabaceae	<i>Vicia faba</i> L.	-/-
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i> L.	-/-
		-/-
	<i>C. annuum</i> L. var. <i>grossum</i> (L.) Sendtn.	-/-
		-/-
	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.	-/-
	<i>C. chinense</i> Jacq. × <i>Capsicum frutescens</i> L.	-/-
	<i>C. frutescens</i> L.	-/-
	<i>C. frutescens</i> var. <i>conooides</i> (Mill.) L. H. Bailey	-/-
	<i>Datura stramonium</i> L.	CL/-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.	CL/M
	<i>Nicotiana debney</i> Domin.	-/M
	<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	-/m
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. 'Vam-Hicks'	CL/m
	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	-/-
		-/m
		-/m
		-/-
	<i>Solanum melongena</i> L.	-/m
		-/m
		-/-

^z Symptoms on inoculated leaves and upper uninoculated leaves indicated to left and right of slash, respectively. - : no infection; NL: necrotic lesions; CL: chlorotic lesions; M: mosaic; and m: mild or symptomless infection confirmed by ELISA or RT-PCR.

初步鑑定為 PluMV，參考 PluMV 序列，設計引子對如表 2，依圖 2 定序策略進行 DR-TW 基因體全長度之定序。病毒之 5' 端及 3' 端之核酸序列則分別以 5'RACE 及 3'RACE 試劑組 (5'RACE/3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 增幅，反應條件依試劑組建議之方式進行。再以 FrMV-Rsp-F1/FrMV-CP-R1 增幅 replicase small protein (RSP) 及 coat protein (CP) 之間的核苷酸序列，黏合溫度為 55°C，延長時間為 5 min，DNA polymerase (Takara Ex Taq DNA polymerase, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 預期生成片段約 5 kb。將前述 PCR 產物委由明欣生物科技有限公司 (台灣台北市) 進行定序。解序所得之序列，以 SeqMan Pro

(Lasergene 13, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) 進行 contig 組裝。

專一性引子對設計及專一性測試

以定序後 DR-TW 分離株的核苷酸序列為模板，設計專一性引子對 PLuMVcp-up (5'-GAATTTGCTAGAGTCCCAGTTG-3')/PLuMVcp-dw (5'-AGATGTACCTGCCCCGAAGTC-3')，反應溫度及時間如下，先於 95°C 反應 5 min，4°C 反應 15 min，42°C 反應 60 min，95°C 反應 15 min，之後再進行 35 個循環 95°C 15 s、64°C 15 s、70°C 60 s，最後再進行 70°C 10 min。RT-PCR 產物以 1.2% agarose 進行電泳分析，預估可增幅出 643 bp 之產物。為確認 PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw 之專一性，取與 DR-TW 同為 *Tobamovirus* 屬的 8 個病毒種：PMMoV、

表 2. 緬梔嵌紋病毒 (PluMV) 全長度基因體定序所設計的引子。

Table 2. Primers used for complete genome sequence of *Plumeria mosaic virus* (PluMV).

Name	Sequence (5'-3')	Target site	Reference
5'-race AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGHIIGGGHIIGGGIIG	5'-end	5'-RACE
5'-race AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	5'-end	5'-RACE
FrMV-5 race1	AGTTCTAGTGGTATGTCCCA	RSP	This study
FrMV-5 race2	CCTTTCGAAACCAAACACTC	RSP	This study
FrMV-3 race1	CTCGTTCTTATAATTCCTGGCGT	CP	This study
FrMV-3 race2	ACTCAATCCGCTCGGGATGAGT	CP	This study
FrMV-Rsp-F1	AAGCGGACATCGACGACGAGT	RSP	This study
FrMV-CP-R1	ACGCCAGGAATATAAGAACGAG	CP	This study
3'-race AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T ₁₇)	3'-end	3'-RACE
3'-race AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3'-end	3'-RACE

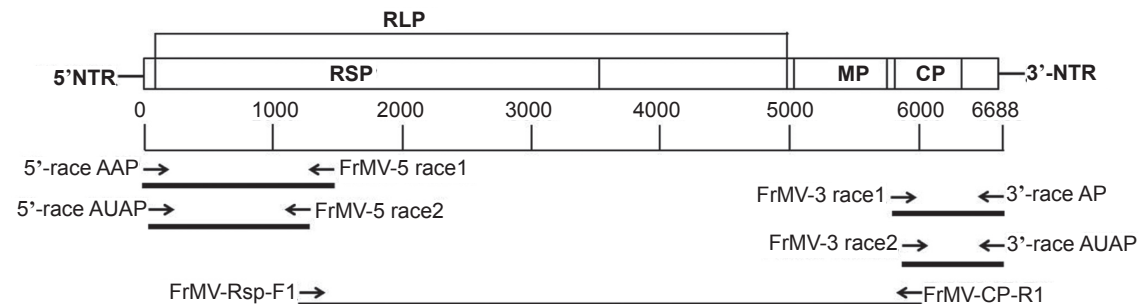


圖 2. 緬梔嵌紋病毒 (PluMV) DR-TW 分離株全長度基因體之解序策略及示意圖。

Fig. 2. Schematic representation of *Plumeria mosaic virus* (PluMV) isolate DR-TW full genome cloning strategies. 5'-NTR: 5'-nontranslated region; RLP: replicase large protein; RSP: replicase small protein; MP: movement protein; CP: coat protein; and 3'-NTR: 3'-nontranslated region.

TMV、ToMV、WMoV、CGMMV、*Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)、HLSV 及 FrMV 進行測試。為鑑別 PluMV 與 FrMV。另設計 FrMV 專一性引子對 FrMVcp-up (5'TATTTAT-TACGCGGTAGTAGTA-3')/FrMVcp-dw (5'-TGAGTCGTAGAGTCTTGACAGA-3')，反應溫度及時間如下，先於 95°C 反應 5 min，4°C 反應 15 min，42°C 反應 60 min，95°C 反應 15 min，之後再進行 95°C 15 s、64°C 15 s、70°C 60 s，共 35 個循環，最後再進行 70°C 10 min。預期片段大小 573 bp，與前述 PluMV 專一性引子對 (PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw)，共同偵測包括 FrMV 及 PluMV 感染的雞蛋花病毒材料 (Lin *et al.* 2018)。

結果

寄主範圍

DR-TW 接種試驗結果如表 1，8 科 25 種植物中，番杏、紅藜、奎藜、綠藜、千日紅及曼陀羅接種後都在接種葉形成局部病斑 (圖 1B-1G)，圓葉菸接種後出現局部病斑以外也發展出系統性嵌紋病徵 (圖 1H)。這些反應與部分 tobamoviruses 的特性相似，但 DR-TW 分離株對番茄、甜椒、辣椒、茄子等的病原性

及致病力均弱於 ToMV (Deng *et al.* 2012)。DR-TW 分離株接種 5 棵雞蛋花 (*Plumeria rubra*) 實生苗都產生系統嵌紋，其中之一病徵如圖 1I 所示，其感染可由 ELISA 及 RT-PCR 證實，但翌年病株的病徵全都消失，也無病毒檢出。回接沙漠玫瑰白花及紅花品種，實生苗都產生系統性嵌紋，且病徵歷久不退，甚至延及花器 (圖 1J)，病徵與原來供試樣本相同，也可檢出病毒，茲可證明 DR-TW 為沙漠玫瑰的致病原。

病毒抗體免疫分析

以 ELISA 檢測 DR-TW 與供試 tobamoviruses 抗體的反應，其 ELISA 讀值如表 3 所示，FrMV、TMV、ToMV、WMoV 等抗體可檢出 DR-TW，但與 CGMMV、HLSV、MarMV、ORSV、PMMoV、TMGMV 等抗體則無反應。

以 Western blot 檢測 DR-TW 與供試 tobamoviruses 抗體的反應，其結果如圖 3 所示，利用合成抗原製成的抗體及 ToMV 專一性抗體都可檢出 DR-TW。

病毒核酸檢定

DR-TW 以廣效性引子對 TMVmpf/TMV3nr 進行 RT-PCR，結果未能得到預期片段。

表 3. DR-TW 分離株與其他菸草嵌紋病毒屬病毒抗體反應的 ELISA 讀值。

Table 3. ELISA values (A_{405nm}) of DR-TW reacted with other antibodies to various tobamoviruses.

Antigen	Antibody to									
	CGMMV	FrMV	HLSV	MarMV	ORSV	PMMoV	TMGMV	TMV	ToMV	WMoV
CGMMV	0.304	0.042	0.048	0.008	0.160	0.012	0.005	0.039	0.058	0.387
FrMV	0.009	0.015	0.063	0.013	0.093	0.023	0.076	0.073	0.132	0.194
HLSV	0.022	0.030	0.215	0.578	0.289	0.037	0.012	0.017	0.118	0.084
MarMV	0.000	0.024	0.056	0.020	0.048	0.018	0.001	0.016	0.078	0.088
ORSV	0.011	0.492	0.014	0.089	0.647	0.188	0.200	1.786	0.646	0.321
PMMoV	0.009	0.097	0.056	0.018	0.537	1.028	0.394	0.966	0.266	0.095
TMGMV	0.004	0.015	0.063	0.008	0.095	0.020	0.062	0.023	0.217	0.228
TMV	0.027	0.448	0.051	0.026	0.239	0.075	0.018	1.594	0.353	0.421
ToMV	0.023	0.703	0.027	0.034	0.341	0.196	0.028	1.907	1.263	0.202
WMoV	0.015	0.249	0.057	0.193	0.350	0.059	0.025	0.398	0.030	0.321
DR-TW	0.023	0.628	0.056	0.012	0.178	0.013	0.049	0.460	0.164	0.151
HCK	0.030	0.041	0.049	0.002	0.094	0.026	0.033	0.048	0.050	0.039

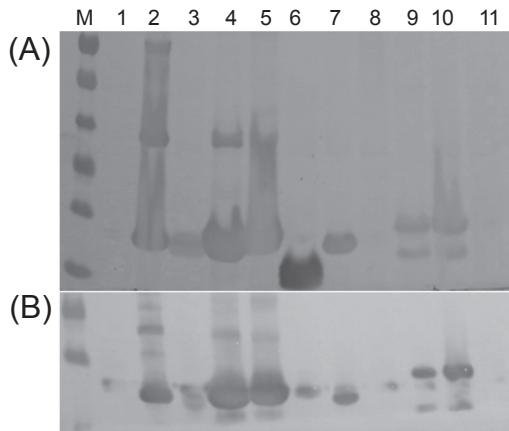


圖 3. 利用 (A) tobamovirus 廣效性多元抗體及 (B) ToMV 抗體與一些菸草嵌紋病毒屬病毒進行西方墨漬法反應的結果。

Fig. 3. Results of Western blot using antibodies (A) to “fusion tobamovirus immunogens”, and (B) to ToMV. The tested antigens are indicated on the top of each lane: M (Molecular marker), 1 (HCK), 2 (PMMoV), 3 (TMV), 4 (ToMV), 5 (WMoV), 6 (CGMMV), 7 (ORSV), 8 (HLSV), 9 (DR-TW on desert rose), 10 (DR-TW on *Chenopodium quinoa*) and 11 (CMV on desert rose).

另以引子對 TobRT up1/TobRT do2 進行 RT-PCR，則可增幅出約 568 bp 的核酸片段 (圖 4)。此片段解序後，與 GenBank 中核苷酸序列進行比對，結果顯示 DR-TW 與緬梔嵌紋病毒 (Acc. No. KJ395757) 相同度達 98%。

基因體全長度核苷酸序列定序

以表 2 所列的引子及圖 2 示意的策略，進行 DR-TW 之基因體全長度選殖與定序，所得之基因體序列有 6,683 bp 核苷酸，轉錄出 188.3 kDa 及 130.4 kDa 的複製酶、28.7 kDa 的移動蛋白及 19.0 kDa 的鞘蛋白，包含 4 個 ORFs 分別為 ORF1: methyl-transferase (MT)、helicase (Hel) 及 RNA silencing suppressor domains、ORF2: RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)、ORF3: movement protein (MP)、ORF4: coat protein (CP)，及 5' 端與 3' 端非轉譯區。全序列於 GenBank 上之登錄序號為 Acc. No. KX881422。

親緣分析

利用 MEGA 7.0 之 Neighborhood-joining，

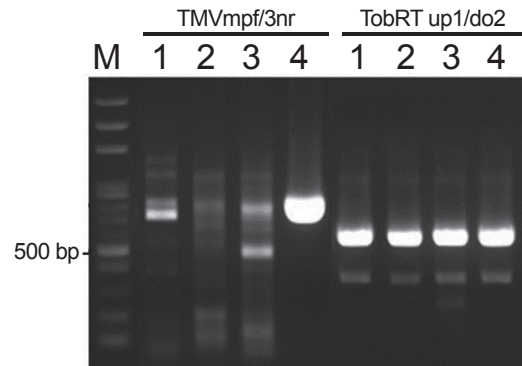


圖 4. 以 TMVmpf/3nr 及 TobRT up1/Tob do2 引子，針對 DR-TW 分離株 (1-4) 進行 RT-PCR 的產物之電泳圖。

Fig. 4. Agarose electrophoreses of the RT-PCR products amplified from isolates of DR-TW (1-4) using primers of TMVmpf/3nr (~800bp) and TobRT up1/Tob do2 (568 bp).

將 DR-TW (Acc. No. KX881422) 與表 4 所列菸草嵌紋病毒屬病毒種的全基因體核苷酸序列繪製成親緣關係樹狀圖 (圖 5)，DR-TW 與印度的 PluMV 分離株 (Acc. No. KJ395757) 相同度達 96.5%、與中國的 FrMV 分離株 (Acc. No. AF165884) 之相同度為 68.3%，與印度的 PluMV 分離株及中國的 FrMV 分離株被歸類於同一群，屬於 Tobamovirus subgroup II 的病毒。將 DR-TW 與 PluMV 及 FrMV 鞘蛋白核苷酸序列 (圖 6 A) 及胺基酸序列 (圖 6 B) 進行多重序列分析，顯示 DR-TW 與 PluMV 具高相同及相似度。綜合以上結果，DR-TW 鑑定為緬梔嵌紋病毒。

專一性引子對測試

為 PluMV 檢測使用，針對其鞘蛋白序列設計一組專一性引子對 P_{LuMVcp-up}/P_{LuMVcp-dw}，並進行專一性測試，結果如圖 7A 所示 DR-TW 增幅出專一性 643 bp 條帶，而 PMMoV、TMV、ToMV、WMoV、CGMMV、ORSV、HLSV 及 FrMV 等則無預期片段產生。取自 DR-TW 增幅出之片段，經定序及比對後，片段與 PluMV (Acc. No. KJ395757) 對應片段相同度達 99%，確認所設計之引子對具專一性。另設計 FrMV 專一性引子對 FrMVcp-up/

表 4. 親緣分析供試菸草嵌紋病毒屬病毒種。

Table 4. List of tested species in genus *Tobamovirus* for phylogenetic analysis.

No.	Species	Accession number
1	<i>Cucumber fruit mottle mosaic virus</i> (CFMMV)	AF321057
2	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV)	D12505
3	<i>Cactus mild mottle virus</i> (CMMoV)	EU043335
4	<i>Frangipani mosaic virus</i> (FrMV)	HM026454
5	<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i> (KGMMV)	AJ295948
6	<i>Hibiscus latent Singapore virus</i> (HLSV)	AF395898
7	<i>Odontoglossum ringspot virus</i> (ORSV)	X82130
8	<i>Plumeria mosaic virus</i> (PLuMV)	KJ395757
9	<i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV)	M81413
10	<i>Ribgrass mosaic virus</i> (RMV)	JQ319720
11	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	HE818426
12	<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	NC_002692
13	<i>Turnip vein-clearing virus</i> (TVCV)	U03387
14	<i>Wasabi mottle virus</i> (WMoV)	KJ207375
15	<i>Youcai mosaic virus</i> (YoMV)	U30944
16	<i>Zucchini green mottle mosaic virus</i> (ZGMMV)	AJ295949

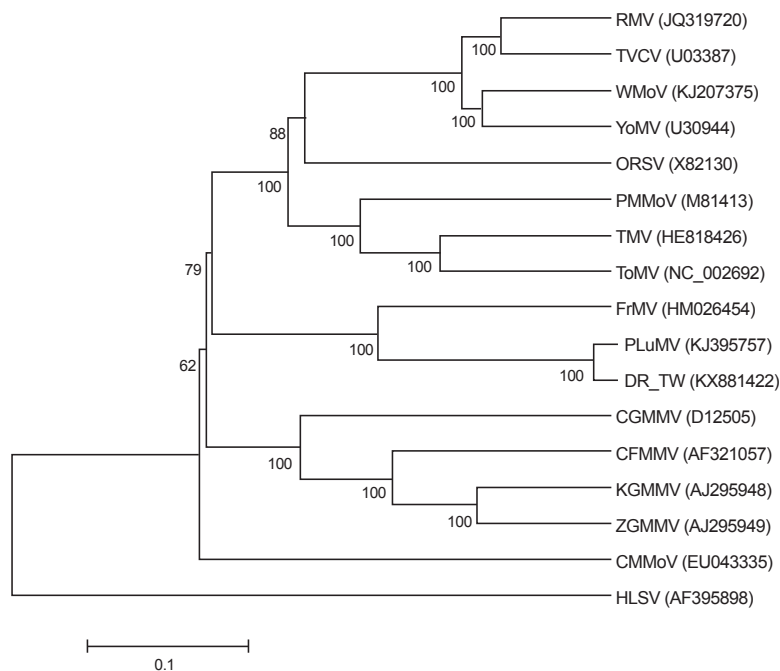
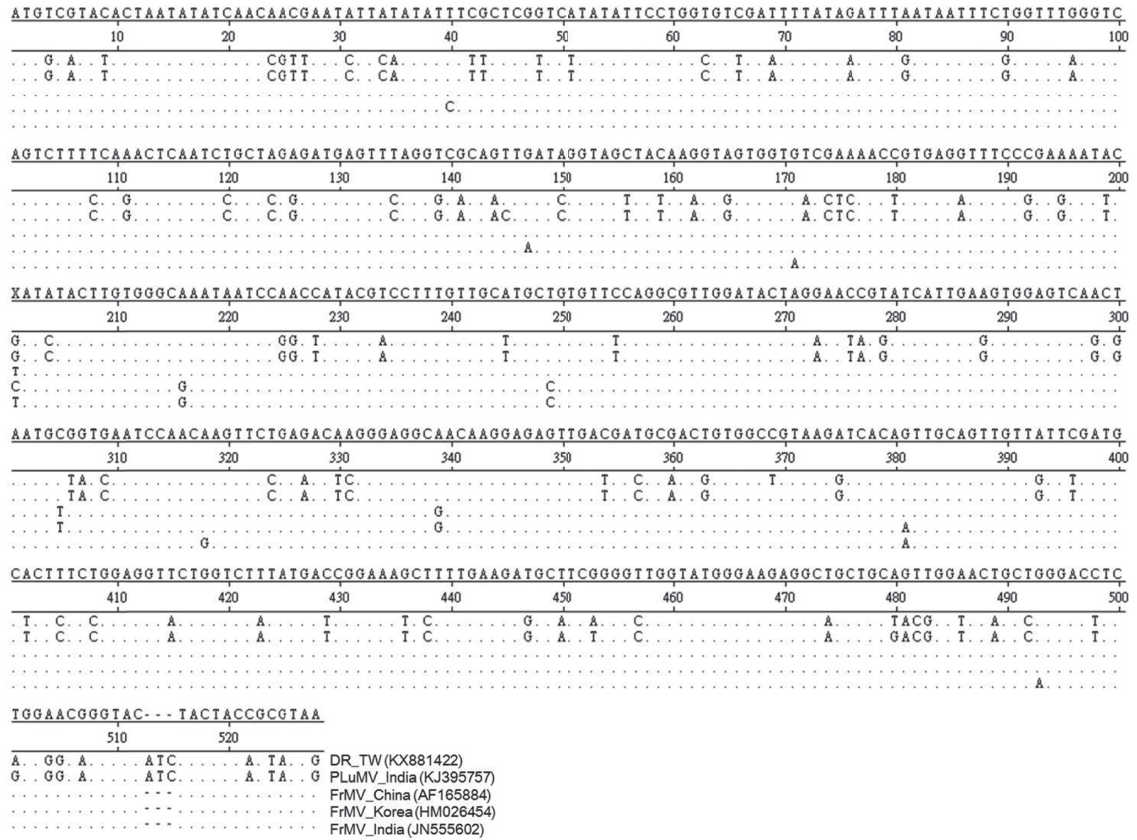


圖 5. 緬梔嵌紋病毒 (PluMV) DR-TW 分離株以 neighborhood-joining method 繪製之全長度基因體親緣分析樹狀圖。

Fig. 5. Phylogenetic analysis of DR-TW (KX881422) and 16 members of the genus *Tobamovirus* based on whole genome sequences. The tree was constructed on MEGA 7.0 by neighborhood-joining method. The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1,000 replications. The following sequences of tobamoviruses for comparisons were obtained from the GenBank database are listed in Table 4.

(A)



(B)

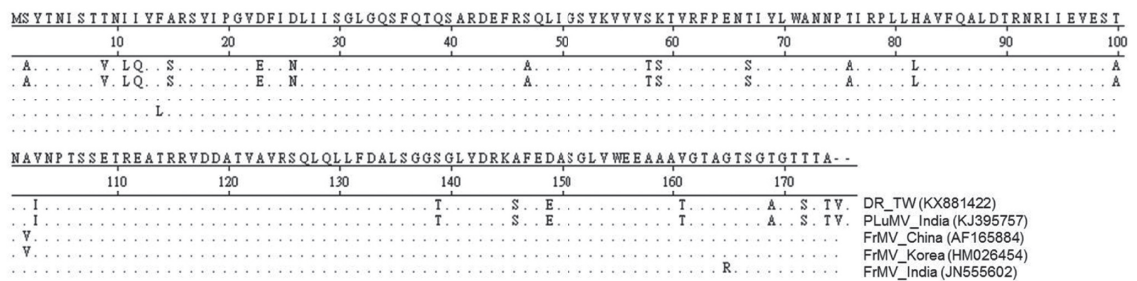


圖 6. 沙漠玫瑰分離株 DR-TW 與緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*) 及雞蛋花嵌紋病毒 (*Frangipani mosaic virus*) 多重序列比對。

Fig. 6. Multiple sequence alignment of nucleotide sequences (A) and amino acid sequences (B) of coat protein (CP) gene from *Plumeria mosaic virus* (Accession numbers: DR-TW isolate KX881422, India isolate KJ395757) and *Frangipani mosaic virus* (Accession numbers: China isolate AF165884, Korea isolate HM026454, India isolate JN555602).

FrMVcp-dw，專一性測試結果如圖 7B 所示，僅 FrMV 增幅出大小為 573 bp 之專一性條帶，與 PMMoV、TMV、ToMV、WMoV、CGM-MV、ORSV、HLSV 及 DR-TW 等則無預期片

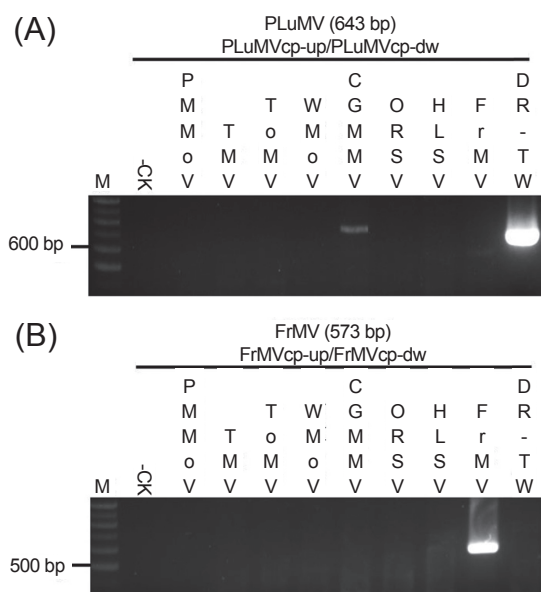


圖 7. 引子對 (A) PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw 及 (B) FrMVcp-up/FrMVcp-dw 專一性測試之電泳圖，供試病毒株包含 PluMV 沙漠玫瑰病毒分離株 (DR-TW) 及另外 8 個 tobamoviruses。

Fig. 7. Agarose electrophoreses of the RT-PCR products amplified from PluMV isolate DR-TW and other 8 tobamoviruses using primers of (A) PluMV-specific PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw and (B) FrMV-specific FrMVcp-up/FrMVcp-dw.

段產生，此引子對亦具專一性。將 FrMV 專一性引子對 FrMVcp-up/PLuMVcp-dw，與 PluMV 專一性引子對 PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw，共同檢測 FrMV 及 PluMV 感染的雞蛋花病毒材料，結果如圖 8，電泳結果可鑑別 PluMV 與 FrMV，在 6 個雞蛋花罹病標本中，檢出 6 個帶有 FrMV，其中 2 個還與 PluMV 複合感染。

討論

沙漠玫瑰與雞蛋花同屬夾竹桃科 (Apocynaceae)，台灣生物多樣性資訊網 (Tai-BIF) (<http://taibif.tw/zh/namecode/418312>) 稱英文俗名 frangipani 的植物為雞蛋花，學名為 *Plumeria rubra* L.，而稱 *Plumeria* 為緬梔屬。沿此，FrMV 中文應譯為雞蛋花嵌紋病毒，而 PluMV 的中文譯名則稱為緬梔嵌紋病毒。

PluMV 的首發記錄於印度的雞蛋花 (Kumar *et al.* 2013)，並在 2016 年被 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 接受為 *Tobamovirus* 屬的一病毒種，屬於 *Virgaviridae* 科 (Adams *et al.* 2017)。至目前為止，GenBank 內 PluMV 的全基因體序列只有 3 筆，除了印度的 isolates (NC_026816 及 KJ395757) 外，來自台灣的 DR-TW (KX881422) 為另外唯一的紀錄，而 DR-TW 卻是從沙漠玫瑰分出來的，因此本研究是 PluMV 感染沙漠玫瑰的首發報告。

FrMV 文獻早有完整的紀錄 (Varma & Gibbs 1978)，在台灣也發生於雞蛋花上 (Cho-

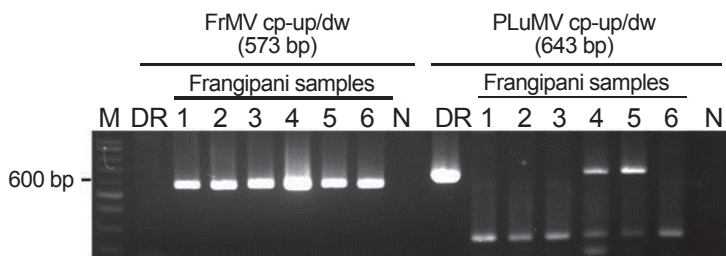


圖 8. 利用 2 組專一性引子對 FrMVcp-up/FrMVcp-dw 及 PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw 分別檢測田間雞蛋花罹病樣本 (1-6) 之電泳圖。

Fig. 8. Agarose electrophoreses of the RT-PCR products amplified from diseased frangipani samples (1-6) using specific primers of FrMVcp-up/FrMVcp-dw and PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw. All 6 samples were positive to FrMV and 2 of them were also positive to PluMV. DR: PluMV isolate DR-TW; N: water for negative control.

liq *et al.* 2014)。至於感染沙漠玫瑰的病毒，曾有 CMV 的發生報告 (Chen *et al.* 2012)。鄭志文曾首次從沙漠玫瑰分離出桿狀病毒，但未完成病毒種的鑑定 (Zheng 2011)。作者以菸草嵌紋病毒屬廣效性引子對 TMVmpf/TMV3nr 進行 RT-PCR，結果未能得到預期結果。再引用 Choliq *et al.* (2014) 的廣效性引子對進行 RT-PCR，雖可增幅出 568 bp 的核酸片段，但其序列與 FrMV 的 AF165884、JN555602 及 HM026454 之對應片段相同度最高都只達 79–80%，未能完成種的鑑定 (Deng *et al.* 2015)。本研究進一步分析 DR-TW 的 CP 基因，經與 PluMV 印度分離株的 KJ395757 比對，其相對片段相同度高達 99.1%。再經設計引子，逐步完成核酸全長解序後，DR-TW 與 PluMV (KJ395757) 基因體相似度為 98%，證實 DR-TW 屬於 PluMV。

PluMV 分離株 DR-TW 雖如 TMV 或 ToMV 可感染判別寄主的番杏及藜科植物，但結果顯示其對茄科作物的致病力並不高，接種試驗中對各種供試番椒、瓜類、豆類及十字花科植物都無病原性，因此 PluMV 的發生對經濟作物較無風險。

PluMV 分離株 DR-TW 對 FrMV 的抗體有交互反應，且親緣分析顯示與 FrMV 歸屬同一群。應用 TMV、ToMV 及廣效性 tobamovirus 抗體都可在免疫反應中偵測出 PluMV。

同時應用專一性引子對 P_LuMV_cp-up/P_LuMV_cp-dw 及 FrMV_cp-up/P_LuMV_cp-dw 可鑑別 PluMV 及 FMV，初步調查雞蛋花除 FrMV (Choliq *et al.* 2014) 以外，PluMV 也有發生單獨或與 FrMV 複合感染狀況 (Lin *et al.* 2018)。

本研究所應用的病毒抗體檢驗方法與試劑，以及其中所發展的 RT-PCR 技術都可提供到沙漠玫瑰及雞蛋花健康種苗的篩檢，用以建立永續的健康花園。

誌謝

感謝行政院農業委員會高雄區農業改良場陳明吟助理研究員採集沙漠玫瑰罹病材料。

引用文獻

- Adams, M. J., E. J. Lefkowitz, A. M. King, B. Harrach, R. L. Harrison, N. J. Knowles, A. M. Kropinski, M. Krupovic, J. H. Kuhn, A. R. Mushegian, M. Nibert, S. Sabanadzovic, H. Sanfacon, S. G. Siddell, P. Simmonds, A. Varsani, F. M. Zerbini, A. E. Gorbalenya, and A. J. Davison. 2017. Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch. Virol.* 162:2505–2538.
- Chen, Y. K., Y. S. Chang, Y. W. Lin, and M. Y. Wu. 2012. First report of *Cucumber mosaic virus* in desert rose in Taiwan. *Plant Dis.* 96:593.
- Choliq, F. A., T. H. Chen, and L. Sulistyowati. 2014. Molecular characterization of a rigid rod-shaped virus isolated from frangipani (*Plumeria* sp.) showing mosaic symptom in Taiwan. *J. Exp. Life Sci.* 7:1–6.
- Chou, C. M., C. T. Chen, C. H. Tsai, C. C. Chen, and T. C. Deng. 2018. Immunogenicity of tobamovirus universal antibodies raised against expressed protein encoded by a synthetic polynucleotide containing epitope genes of ToMV, ORSV and CGMMV. *J. Taiwan Agric. Res.* 67:301–308.
- 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.
- Deng, T. C., M. C. Chen, C. H. Tsai, Y. T. Lin, and J. Y. Liao. 2011. The occurrence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* and *Hibiscus latent Singapore virus* in Malvaceae plants in Taiwan. p.V05. in: Abstract of 2010 Annual Meeting of Taiwan Phytopathological Society. March 25–26, 2011. Taichung, Taiwan. Taiwan Phytopathol. Soc., Taichung, Taiwan. (in Chinese)
- Deng, T. C., Y. T. Lin, C. H. Tsai, J. Y. Liao, Y. H. Cheng, Z. H. Lee, C. C. Shih, and Y. C. Chen. 2012. Identification and occurrence of a *Tomato mosaic virus* infecting pepino (*Solanum muricatum*) plants in Penghu, Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 54:47–64. (in Chinese with English abstract)
- Deng, T. C., C. H. Tsai, Y. H. Chien, M. J. Lin, and M. Y. Chen. 2015. Characterization of a tobamovirus isolated from desert rose (*Adenium obesum*) in Kaohsiung, Taiwan. *Plant Path. Bull.* 24:152–153. (in Chinese)
- Deng, T. C., C. H. Tsai, and F. Y. Ning. 2016. Identification of *Wasabi mottle virus* infecting wasabi in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 65:103–108. (in Chinese with English abstract)
- Dovas, C. I., K. Efthimiou, and N. I. Katis. 2004. Generic

- detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. *J. Virol. Methods* 117:137–144.
- Huang, J. G., C. L. Deng, Z. F. Fan, G. Z. Tian, and H. F. Li. 2004. Isolation and identification of *Tobacco mosaic virus* infecting *Syringa oblata*. *Acta Phytopathol. Sin.* 34:215–220.
- Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55:53–62.
- Kumar A., V. Solanki, and B. Madal. 2013. *Frangipani mosaic virus* and *Plumeria mosaic virus*: Identification and comparison of two tobamovirus infecting frangipani in India. *in*: Proceeding of the Asia-Pacific Congress of Virology. December 17–20, 2013. Indian Virol. Soc., Nodia, India.
- Liao, J. Y., C. C. Hu, J. L. Kao, and T. C. Deng. 2007. Identification of *Tobacco mosaic virus* infecting *Rehmannia glutinosa*. *Plant Pathol. Bull.* 16:61–69. (in Chinese with English abstract)
- Lin, Y. T., C. H. Tsai, M. J. Lin, Y. H. Chien, and T. C. Deng. 2018. Isolation and identification of *Plumeria mosaic virus* from desert rose and plumeria in Taiwan. *J. Plant Med.* 60(3–4):66–67. (in Chinese)
- Towbin, H., S. Theophil, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350–4354.
- Varma, A. and Gibbs, A. J. 1978. *Frangipani mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No.196. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=196> (visit on 08/20/2019)
- Zheng, Z. W. 2011. Characterization of a rigid-rod-shaped virus isolated from desert rose [*Adenium obese* (Forssk.) Roem. & Schult.] showing mosaic symptom in Taiwan. Master Thesis, Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung, Taiwan. 57 pp. (in Chinese with English abstract)

Identification and Detection of *Plumeria mosaic virus* Infecting Desert Rose (*Adenium obesum*)

Yi-Ting Lin¹, Chin-Hui Tsai¹, Mei-Ju Lin², and Ting-Chin Deng^{3,*}

Abstract

Lin, Y. T., C. H. Tsai, M. J. Lin, and T. C. Deng. 2020. Identification and detection of *Plumeria mosaic virus* infecting desert rose (*Adenium obesum*). *J. Taiwan Agric. Res.* 69(1):77–89.

A diseased sample of desert rose (*Adenium obesum*) cv. Dahuahua showing virus-like symptom was found in Kaohsiung in 2013. The pure virus isolate (DR-TW) was obtained by inoculation to *Chenopodium quinoa* through single lesion transfer. Immunoassay showed that the isolate interacted crossly with the other tobamoviruses, including *Frangipani mosaic virus* (FrMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), etc. After sap inoculation, local lesions were developed on leaves of *Tetragonia tetragonioides*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium murale*, *Gomphrena globosa* and *Datura stramonium*; and systematic mosaic was showed on plants of *Nicotiana benthamiana*, frangipani and desert rose. However, the pathogenicity and virulence of DR-TW was milder than ToMV to tomatoes, peppers and eggplants. A pair of tobamovirus broad-spectrum primers (TobRT up1/TobRT do2) were applied in RT-PCR to amplify a nucleic acid fragment with 568 bp. Sequence alignment revealed that the RT-PCR fragment shared more than 98% identity with *Plumeria mosaic virus* (PluMV) but only 73% with FrMV. Another primers were designed and used for analysis of complete genome. The full length of genomic nucleotides with 6,683 bp was determined and deposited in GenBank under accession number KX881422. A total of 188.3 kDa and 130.4 kDa of replicates, 28.7 kDa of movement protein and 19.0 kDa of coat protein, were transcribed. A pair of PluMV-specific primers (PLuMVcp-up/PLuMVcp-dw) were designed to amplify a fragment of 643 bp nucleotides by RT-PCR, by which PluMV was detectable and could be distinguished from other tobamoviruses. The FrMV specific primers (FrMVcp-up/FrMVcp-dw) were also applied to differentiate the FrMV from PluMV by RT-PCR.

Key words: Taiwan, Isolate, *Tobamovirus*, *Frangipani mosaic virus*.

Received: August 20, 2019; Accepted: October 25, 2019.

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

¹ Project Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

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

³ Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.