

竹嵌紋病毒鞘蛋白抗血清之製備及其於病毒檢測之應用¹

趙佳鴻²、劉芳麟³、王照仁⁴、白桂芳⁵

摘 要

臺灣中部地區為鮮食麻竹筍的重要產區，近年來產區受到竹嵌紋病毒(bamboo mosaic virus, BaMV)感染，影響品質與產量，且有愈來愈嚴重之趨勢。本研究自臺中市大坑地區麻竹栽培園採集帶有嵌紋病徵的植株葉片後，以前人製備之 BaMV 鞘蛋白(coat protein, CP)抗血清(anti-BaMV-CP serum)檢測後，判定為 BaMV 罹病樣品。進一步抽取罹病樣品之全量核酸，以 GenBank 中已知 BaMV-CP 基因序列所設計之引子對進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)，增幅出與預期相符約 750 bp 之 DNA 片段。此 DNA 片段經選殖、定序及分析後，顯示其核苷酸序列與 GenBank 上已登錄之 BaMV CP 基因相同度(identity)大於 72%，對應的胺基酸序列之相同度大於 80%，確認為 BaMV 之 CP 基因，並將此 CP 基因來源的病毒定名為 BaMV 大坑選植株(BaMV-DK)。為製備高專一性的 BaMV 抗血清，以 pET 系統在 *E. coli* Rosetta (DE3) 內大量表現 BaMV CP，並將純化蛋白免疫兔子後生產 BaMV 之抗血清(RB2025-BaMV 及 RB2026-BaMV)，具高度專一性，可於田間樣品偵測到 BaMV，將做為生產無 BaMV 種苗有力的偵測工具。

關鍵詞：麻竹、竹嵌紋病毒、病毒檢測、細菌表現病毒鞘蛋白

前 言

臺灣栽培食用竹主要可分為麻竹、綠竹、烏腳綠竹、桂竹及孟宗竹。臺中市大坑區、太平區及彰化縣花壇鄉為中部食麻竹筍主要產區，2019 年農業統計年報資料顯示臺中市與彰化縣麻竹筍栽培面積 1,436 公頃，年產量為 16,095 公噸⁽⁹⁾。以往麻竹在山區種植較多，屬極粗放型作物。隨栽培技術改良，部分地區鮮食用筍採以塑膠布或稻草覆土栽培方式，增加地溫以利發筍，嫩度及品質大幅改進，鮮筍產量逐年增加，每年 5-9 月是麻竹筍盛產期。

¹行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0988 號。

^{2,4,5}行政院農業委員會臺中區農業改良場副研究員、助理研究員、研究員。

³一邱雅士有限公司經理。

2010年9-12月在3個中部麻竹筍產區(大坑、太平及草屯)，進行7種主要病蟲害調查，調查結果顯示竹嵌紋病罹病率最高地區可達38%，最低地區亦有25%，且因農友缺乏防範病毒病害之觀念，造成竹嵌紋病有愈來愈嚴重之趨勢⁽⁶⁾。1974年此病害被發現，當時稱為褐條病，爾後被確認為病毒所引起，並命名為竹嵌紋病毒(bamboo mosaic virus, BaMV)⁽¹⁴⁾。BaMV是至目前發現感染竹類之唯一病毒，屬於Potexvirus屬，具有單鏈正股RNA基因體，病毒顆粒為長絲狀，在室溫中穩定性佳，主要經由機械傳播^(11,15,17)。由於竹之栽培是藉由無性分株法繁殖，病毒因而遍及全臺，大多數具有經濟重要性之竹種均可罹病，竹感染此病毒後，在葉片形成黃化或褐化的條斑病徵，嫩葉上有明顯嵌紋病徵，而在竹筍與竹莖橫剖面上皆可觀察到褐色至黑色的短釘狀病斑，農民俗稱為“筍釘”(圖一)，造成竹筍組織硬化，影響竹筍之產量與品質甚鉅。

竹嵌紋病首次於1977年在巴西被記錄⁽¹⁸⁾，除南美外，BaMV隨後在世界各地被報導，包括北美，亞洲(在臺灣、印度、菲律賓及中國大陸等)及澳大利亞^(10,12,16)，由於沒有任何化學農藥可以防治植物病毒病害，因此最好的防治策略就是避免寄主植物有機會接觸到植物病毒，而對於主要經由機械傳播之竹嵌紋病，最佳的防治策略就是種植BaMV-free的植物。1989年行政院農業委員會臺南區農業改良場利用酵素結合抗體檢定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)從田間篩選無BaMV綠竹建立繁殖用母本園，利用生產無BaMV之綠竹苗防治綠竹嵌紋病毒示範推廣工作成效良好⁽⁷⁾。但由於利用傳統之病毒純化方法不容易從罹病麻竹之葉片純化BaMV^(5,8)，因此本研究利用細菌(*E. coli*)表現BaMV之鞘蛋白(coat protein, CP)製備多元抗體，運用於田間篩選無BaMV麻竹植株，以此工具來建立無BaMV麻竹母本園、麻竹繁殖園及麻竹苗圃。



圖一、竹嵌紋病毒(bamboo mosaic virus, BaMV)感染在竹上造成的病徵。(A)在筍橫剖面上呈現短釘狀病斑，農民俗稱為”筍釘“，造成竹筍組織硬化。(B)嫩葉會出現黃綠相間之條型嵌紋病徵。(C)較老竹桿有很明顯之黃綠相間嵌紋，並間雜褐色條斑。

Fig. 1. The symptoms caused by the infection of bamboo mosaic virus (BaMV) on bamboo plants. (A) Short spike-like lesions on the transverse section of the bamboo shoots, the farmers commonly call "bamboo spikes", that caused the hardening of the tissues on bamboo shoots. (B) The young leaves usually show chlorotic mottling or mosaic patterns which run parallel with the veins. (C) The necrotic streaking on leaf sheath of the matured bamboo stalks.

材料與方法

一、病毒來源與保持

自臺中市大坑地區麻竹栽培區，採集疑似罹染BaMV植株的新葉，利用anti-BaMV-CP抗血清⁽¹²⁾進行間接酵素連接免疫吸附分析試驗(indirect-ELISA)檢測，選取呈現正反應之植株，再移植至本場溫室供後續試驗所需。

二、反轉錄-聚合酶鏈式反應(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

取 0.1 g 之罹病葉片，使用植物總量 RNA 純化試劑套組 Plant Total RNA Miniprep Purification Kit (GeneMark, GMbio Lab. Co. Ltd., Taichung, Taiwan) 進行全量 RNA 之純化。以純化所得之 RNA 為模板，BaMV CP 專一引子對 BCP5497f/BCP6225r (5'-GATGTCTGGAAGTGGAAACAGGAAC-3'/5'-TTAGTCTGACGTTGGTTCGGAAG-3')(中興大學胡仲祺教授提供) 進行 RT-PCR，採用單步驟 RT-PCR 試劑組(GeneMark, GMbio Lab. Co. Ltd., Taichung, Taiwan)，每 25 μ l 反應液中分別含 2 μ l 全量 RNA、5 μ l 5X PCR buffer、5 μ l enhancer buffer、11.3 μ l RNase free water、0.5 μ l Reverse transcription polymerase、及 0.6 μ l 之 20 μ M BCP5497f/ BCP6225r 引子，於熱循環反應機(GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT)中，設定反應程序為 50°C 30 分鐘，94°C 變性 2 分鐘，之後進行 30 個 PCR 循環反應(94°C 變性 45 秒，58°C 煉合 45 秒，72°C 聚合 2 分鐘)，最後進行 1 個 72°C 延長反應 7 分鐘。此 RT-PCR 反應預估可增幅出約為 730 bp 大小之 DNA 片段，反應結果以 1.2% agarose 瓊膠進行電泳分析。

三、核酸片段選殖和核苷酸序列分析

將 RT-PCR 增幅所得之 730 bp DNA 片段選殖於 pGM-T 載體(GeneMark, GMbio Lab. Co., Ltd., Taichung, Taiwan)上，經篩選出含有 740 bp 嵌入片段之選殖株，再送自動核酸定序儀(ABI 3730xl DNA Analyzer)分析其核苷酸序列，所得之序列與 NCBI GenBank 上已登錄之 BaMV 分離株之 CP 基因序列進行比對鑑定。

四、BaMV CP 之蛋白表現與純化

參考 NCBI GenBank 中已登錄之 BaMV 臺灣株之 CP gene 序列(Accession: D26017)，設計可放大 BaMV CP 的專一性引子對 NcoI-BaMV-CP-F/XhoI-BaMV-CP-R (5'-ccATGGGTATGTCTGGTACGGGACTGGTAC-3'/5'-CTCGAGATCGCTAGTAGGTTCCGGCAG-3')，並在此引子對上設計可構築於 pET28b (Novagen Inc. Madison, WI, USA) 表現載體的限制酵素切位(*Nco* I 和 *Xho* I)。以感染 BaMV 之麻竹全量 RNA 為模板進行 RT-PCR 反應，將增幅所得之 BaMV 鞘蛋白核酸以 *Nco* I 和 *Xho* I 切割回收後，以 T4 DNA Ligase 黏合於同樣經 *Nco* I 和 *Xho* I 切割之 pET-28b (+) 載體，並轉型於 *E. coli* strain Rosetta (BL21)。轉型株經 1 mg/mL 之 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質表現，後將培養之菌液以 8,000 rpm 離心 10 分鐘後，收集蛋白質進行 SDS-PAGE 電泳確認蛋白表現，預期表現蛋白為 28 kDa，並進一步以 Ni-NTA 親合性層析管柱(Invitrogen, Massachusetts, USA) 純化帶有 6x His 的表現蛋白，並以此蛋白進行後續抗血清的製備⁽³⁾。

五、BaMV 抗血清製備

抗血清製備委由禾鑫生技開發企業社製備抗血清。製備步驟為，取 100 μ g 純化後的細菌表現 BaMV 鞘蛋白溶於 1 mL PBS(phosphate buffered saline)，與 Freund's complete adjuvant(Difco

Laboratories, BD, NJ)混合乳化後，採皮下注射方式注射於紐西蘭白兔，一週後再以同量的純化蛋白(100 µg 溶於 1 mL PBS)混合 Freund's incomplete adjuvant 注射之，連續注射 4 週後開始自兔子耳靜脈採血，每週採血一次。每次採血後將血液於 37°C 靜置 1 hr，之後於 4°C 靜置 30 分鐘，以 4,000 rpm 離心 5 分鐘，收集上層血清，即為 BaMV CP 之抗血清。

六、Indirect-ELISA

利用 indirect ELISA 測試所製備的抗血清力價(titer)及其血清反應。純化之 BaMV CP 配製 200 ng/well(ELISA 盤孔穴)以 200 µl coating buffer(15 mM Na₂CO₃, 34 mM NaHCO₃ and 3 mM NaN₃, pH 9.6)混合後，加於 96 孔 ELISA 盤之孔穴中，每樣品需兩重複。另取無加入 BaMV CP 的 coating buffer 做為背景對照。置於 37°C 反應 30 分鐘後，倒掉 96 孔盤中的 buffer，以 PBST buffer (136 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 2 mM KCl, 3 mM NaN₃ and 0.05% Tween 20)沖洗每一孔穴，靜置 3 分鐘後倒掉，重複此步驟三次。再將 BaMV 鞘蛋白抗血清以 enzyme-conjugate buffer(2% PVP-40 and 0.2% ovalbumin 於 1 倍 PBST buffer)序列稀釋後，以 200 µl 加至每孔穴，置於 37°C 反應 30 分鐘後，倒掉抗血清稀釋液，以 PBST buffer 重複沖洗三次。再以鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP) 連結之二次抗體 goat anti-rabbit IgG(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA)，以 enzyme-conjugate buffer 稀釋 5,000 倍後，取 200 µl 加至每一孔穴內，於 37°C 靜置反應 30 分鐘。倒掉二次抗體稀釋液，以 PBST buffer 重複沖洗 3 次。以 p-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate(pNPP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)做為呈色基質，以 substrate buffer(9.7% diethanolamine and 3 mM NaN₃)完全溶解後(1 mg/mL)，以 180 µl 加至每孔穴，於室溫下進行呈色反應。開始呈色後，以 ELISA 讀值儀偵測波長 405 nm 之吸收值，每隔 10-15 分鐘測讀一次，連續測讀至少 1 hr。

七、BaMV CP 抗血清應用於田間麻竹筍罹病植株之檢測

採集臺中市大坑地區麻竹園中，目視葉片出現嵌紋疑似罹染 BaMV 病徵之樣品之葉片，以本研究所製備之 BaMV CP 抗血清(RB2025-BaMV 及 RB2026-BaMV)及 anti-BaMV-CP serum，以 indirect ELISA 稀釋 2,000 倍測試抗血清的反應結果。

結 果

一、感染麻竹筍之 BaMV CP 基因選殖及核酸序列分析

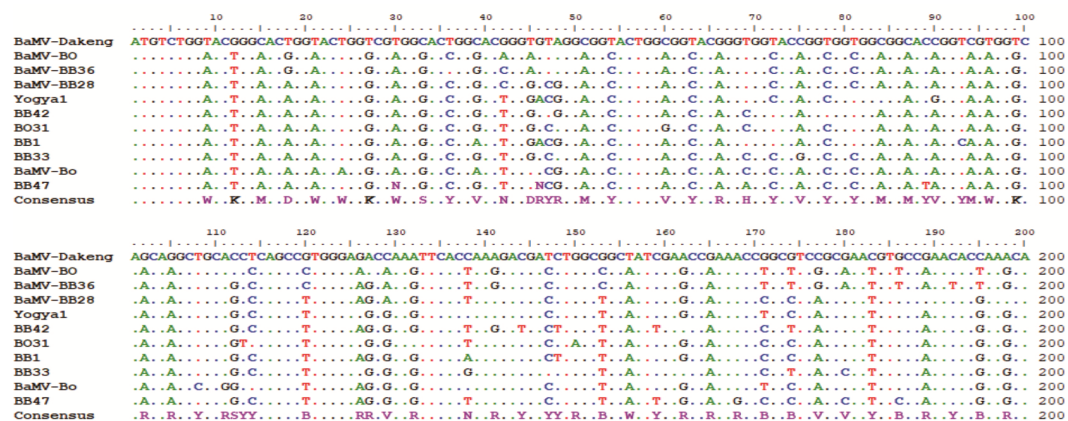
自大坑地區採集有嵌紋病徵之麻竹筍葉片，並以 anti-BaMV-CP serum 確認帶有 BaMV 的罹病組織萃取植物總量 RNA 經 RT-PCR 反應後，於電泳分析中可得到一約 730 bp 的核酸片段，此核酸片段經選殖後之序列分析結果(圖二)。比對結果顯示分離自大坑麻竹筍之病毒核酸序列與 GenBank 上已登錄感染竹筍類之 BaMV 在 CP 基因核苷酸序列之相同度為 74-78%，及胺基酸序列之相同度為

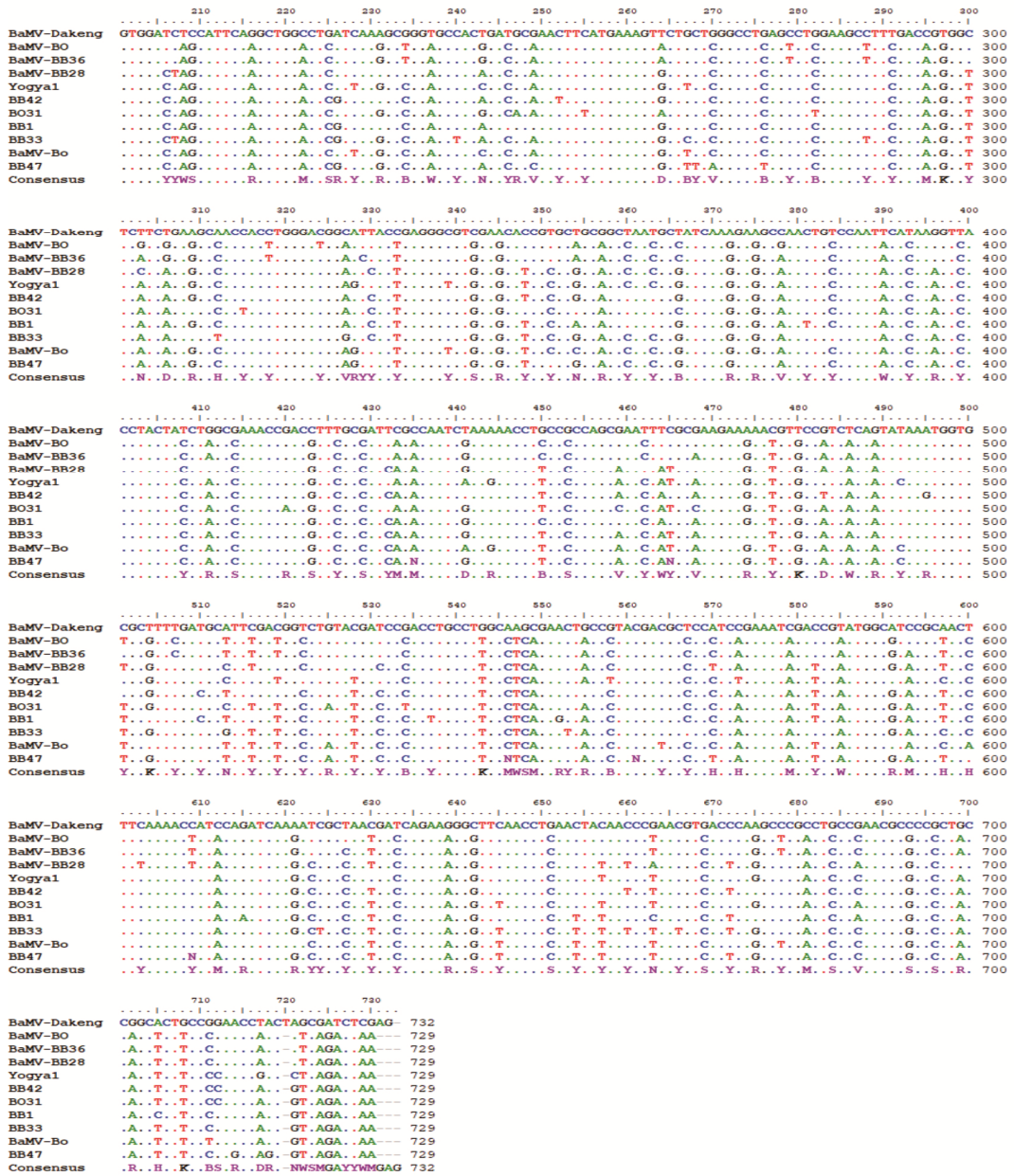
95-100%(表一)。根據國際病毒分類委員會 ICTV 對於 *Potexvirus* 屬病毒的分類定義為 CP 核苷酸序列相同度小於72%(胺基酸序列小於 80%)則定義為不同種(species)，大坑分離的病毒樣品 CP 基因大於此分類標準，確實其為 BaMV 之分離株(BaMV-DK)。

表一、不同竹嵌紋病毒(bamboo mosaic virus, BaMV) 與BaMV-DK 分離株之鞘蛋白基因核苷酸及胺基酸相同度之比較

Table 1. Comparison of the nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences of the coat protein region of the bamboo mosaic virus (BaMV) isolate collected from ma-bamboo in Dakeng area (BaMV-DK) with other BaMV isolates. *(nucleotide (nt), amino acid (aa))

Isolate of BaMV	Accession no.	Location	Host	nt* identity	aa* identity
Dakeng	-	Dakeng	<i>Dendrocalamus latiflorus</i>	100%	100%
BO	LC222494	Taipei	<i>Bambusa oldhamii</i>	78.3%	100%
BB36	LC222488	Chiayi	<i>Bambusa sp.</i>	77.75%	98%
BB28	LC222480	Iran	<i>Bambusa edulis</i>	77.33%	97%
Yogyal	LC278458	Indonesia: Java	<i>Bambusa sp.</i>	77.33%	97%
BB42	LC222490	Nantou	<i>Dendrocalamus strictus</i>	77.19%	97%
BO31	LC222508	Taipei	<i>Bambusa oldhamii</i>	76.91%	97%
BB1	LC222471	Kaohsiung	<i>Bambusa utilis</i>	76.77%	97%
33	LC222485	Chiayi	<i>Bambusa vulgaris</i>	75.94%	97%
Bo	AB543679	Taiwan	<i>Bambusa oldhamii</i>	75.52%	97%
BB47	LC222491	Nantou	<i>Pseudosasa japonica</i>	74.72%	95%



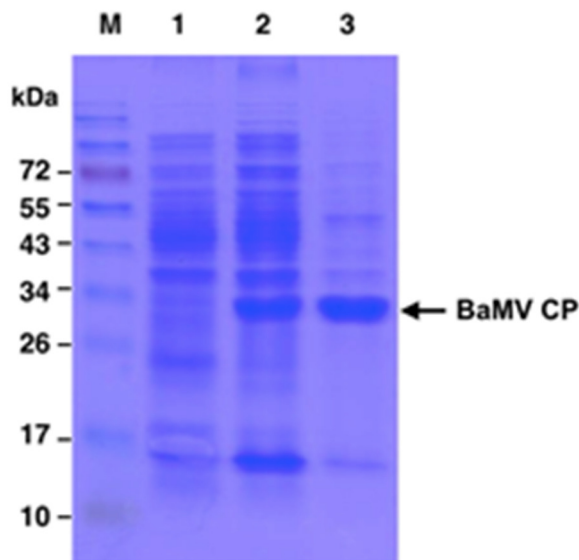


圖二、BaMV-DK CP基因核苷酸序列和10個GenBank上已登錄感染竹筍類之BaMV CP基因核苷酸序列比對分析。

Fig. 2. Multiple nucleotide sequences alignment of the CP genes of BaMV-DK and the other 10 BaMV isolates available in GenBank using the ClustalW program. A consensus sequence obtained from the analysis is shown under the alignment. Nucleotides identical to the consensus nucleotides are indicated by dots within the alignment.

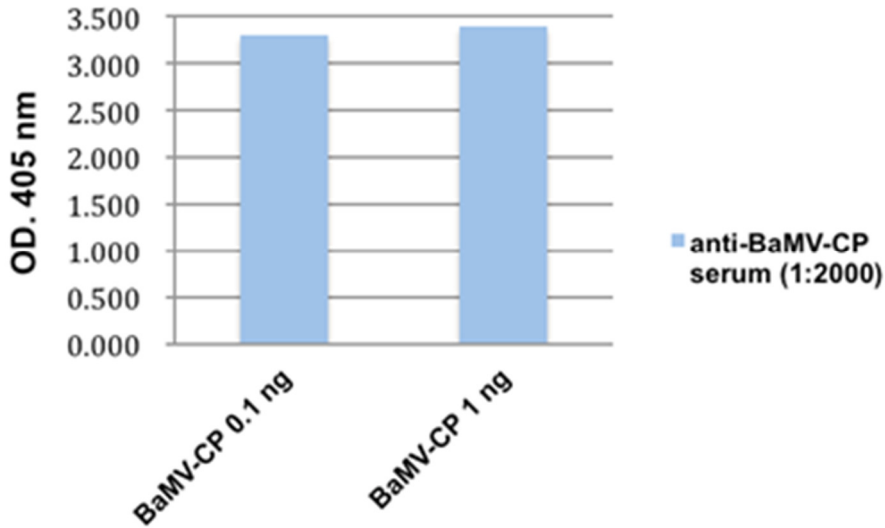
二、BaMV CP 之表現及其抗血清製備

BaMV CP 基因構築於 pET28b(+)載體後，轉型於 *E. coli* strain Rosetta(BL21)表現宿主中，經 IPTG 誘導後表現預期蛋白質大小約 27.72 kDa(圖三)。此表現蛋白經純化後以 indirect ELISA 測試，結果顯示以抗血清 anti-BaMV-CP serum 在 2,000 倍稀釋時，可對此表現蛋白有高度反應(圖四)。進一步將此表現蛋白，免疫注射 2 隻兔子製備出 BaMV CP 抗血清(RB2025-BaMV 及 RB2026-BaMV)以 indirect ELISA 反應測試兩抗血清的力價，在不同稀釋倍數下(5,000 倍、10,000 倍、20,000 倍、40,000 倍及 80,000 倍)皆可與 BaMV CP 表現蛋白(200ng)有高度血清學反應(圖五)。



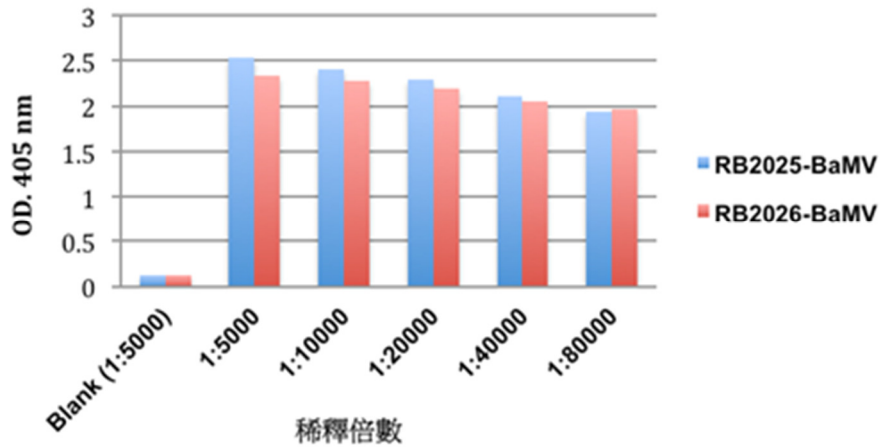
圖三、以 pET-28b(+)載體在大腸桿菌 Rosetta(BL21)菌株細胞中表現 BaMV CP。Lane M：蛋白標準液；lane 1：未誘導菌液；lane 2：以 IPTG 誘導 BaMV CP 表現之菌液；lane 3：Ni-NTA 親和性管柱純化之 BaMV CP。箭頭標示處為細菌表現之 BaMV CP。

Fig. 3. The expression of BaMV CP in *E. coli* Rosetta (BL21) cells with the pET-28b (+) vector. Lane M: protein standard marker, lane 1: uninduced bacterial solution, lane 2: bacterial solution with IPTG induction, lane 3: BaMV CP purified by Ni-NTA affinity chromatography. The expressed BaMV CP is indicated by an arrow.



圖四、BaMV CP 細菌表現蛋白以稀釋倍數 2,000 倍之 anti-BaMV-CP serum 進行 indirect ELISA 測試。

Fig. 4. Serological response of the bacterial-expressed “BaMV CP” reacted with the anti-BaMV-CP serum at a 1/2,000 dilution in indirect ELISA.

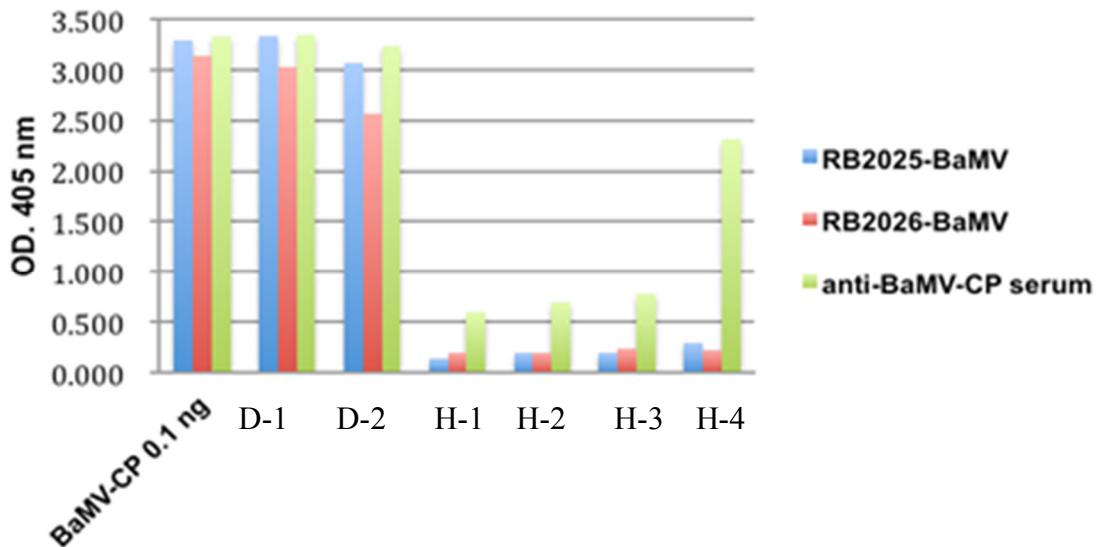


圖五、本研究所製備之 BaMV CP 抗血清 RB2025-BaMV 和 RB2026-BaMV 的力價測試。抗血清以稀釋倍數 5,000 倍、10,000 倍、20,000 倍、40,000 倍及 80,000 倍對純化的 BaMV CP (200 ng) 進行 indirect ELISA 以測試力價。

Fig. 5. Titration test of the produced antisera RB2025-BaMV and RB2026-BaMV against the CP of BaMV. The antisera were used at dilutions of 1: 5,000, 1: 10,000, 1: 20,000, 1: 40,000 and 1: 80,000 to react with the purified BaMV CP (200 ng) for titration test by indirect ELISA.

三、應用 BaMV CP 抗血清進行田間樣品檢測

本試驗中，以 indirect ELISA 檢測大坑地區麻竹園中出現嵌紋之植株葉片 2 個(D-1 和 D-2)及 4 個目視無嵌紋病徵之植株樣品(H-1,H-2,H-3 和 H-4)，結果顯示本試驗中所製備之 2 個抗血清(RB2025-BaMV 及 RB2026-BaMV)在稀釋 2,000 倍時，可穩定偵測出田間感染 BaMV 樣品，同時以 anti-BaMV-CP serum 來偵測(2,000 倍稀釋)也能偵測出田間感染 BaMV 樣品，同樣具有高反應讀值，但抗血清 RB2025-BaMV 及 RB2026-BaMV 對於健康樣品的 ELISA 反應背景值明顯低於 anti-BaMV-CP serum。整體來使用傳統純化病毒方法所製備之抗血清，在呈色 40 分鐘時，2 件罹病樣品之 ELISA 吸光值已經呈現大於 3 之讀值，因為 ELISA 反應的基本讀值明顯偏高，就連健康的竹葉，都有出現最少約 0.573 的讀值，造成結果判定上的干擾，這對於微量病毒的判定十分不易，因為有可能微量病毒的讀值僅僅高於負對照之 2 倍，造成無法釐清這些稍偏高的讀值是微量病毒存在還是血清本身的 background 干擾，如此造成漏檢或者誤判之可能性偏高也增加判讀的困難。這可能肇因於抗體製備不佳，或者製備抗體所用之抗原純化不佳，造成負對照有此高的背景值(4)。結果顯示本研究製備之 BaMV CP 抗血清具有較佳之專一性(specificity)(圖六)。此二抗血清於 101 年-104 年已應用於麻竹筍產區之病毒偵測(表二)。



圖六、抗血清 RB2025-BaMV、RB2026-BaMV 及 anti-BaMV-CP serum 應用於檢測大坑地區麻竹園 BaMV 發生情形。抗血清均以稀釋倍數 2,000 倍對田間樣品進行 indirect ELISA 檢測。

Fig. 6. The antisera of RB2025-BaMV, RB2026-BaMV, and anti-BaMV-CP serum were used to detect BaMV in Ma bamboo leaves in Dakeng area. The antisera were used at a 1: 2,000 dilution for virus detection in indirect ELISA.

表二、RB2026-BaMV 抗血清應用於田間麻竹園樣品檢測

Table 2. Application of the antiserum RB2026-BaMV in BaMV detection in the Ma bamboo samples collected from fields (The detection ratio of BaMV can be described.)

Year/Month	Area	Number of samples	Number of BaMV: positive samples
2012/8	A	16	1
2013/6	B	6	0
2014/4	C	30	3
2015/10	D	70	0

討 論

竹子因其在農業與工業中的廣泛應用而被認為是重要作物，而 BaMV 是對竹類種植與生產具威脅性的病原微生物。在臺灣的竹林中，該病毒的感染率約為 70-80%⁽¹³⁾，故 BaMV 被認為是竹林種植的主要限制因素之一。以往文獻指出此病毒是感染竹類唯一之病毒，屬於 *Potexvirus* 屬，在溫室中穩定性佳，且主要經由機械傳播，因此建立無病毒感染的竹苗生產技術，生長期間隔絕機械傳播病毒的機會，應為一有效預防感染 BaMV 危害的策略。1989 年臺南區農業改良場及 2010 年桃園區農業改良場分別利用目測並配合 ELISA 篩選無感染 BaMV 田間綠竹，建立母樹園，進行利用無病毒綠竹苗防治綠竹嵌紋病的示範推廣工作。該技術不但能降低植株受 BaMV 感染的機會，同時也可增加綠竹筍產量及品質，至今已供苗 60,000 株以上，顯現非常好的效果^(1,7)。使用 ELISA 進行植物病毒檢測具有敏感度佳、結果重現性高、可以快速處理大量樣品及成本較低等優點，應用最為普遍⁽⁸⁾，許多國際種苗公司均將其列為日常例行應用之病毒檢定技術⁽⁴⁾。

病毒感染寄主後，初期病徵表現因限於發病環境、植物品系及生育狀況而影響其症狀顯現，因此目視鑑定較難精確。又因為病毒接種不容易，抗血清之製作又受限於病毒顆粒在竹葉片上純化不易，因此以傳統純化病毒顆粒製作抗血清之品質普遍不佳，導致病毒鑑定之結果混亂，不易判別。由細菌表現系統生產植物病毒之鞘蛋白做為抗原，不但鞘蛋白的生產量高，因免種植植物進行病毒接種，可大幅縮短病毒蛋白質純化及抗血清的製備時間，已為一普及之技術^(2,3)。由於細菌屬於原核生物，與病毒感染的植物真核細胞具有不同的基因表達系統，難免會有鞘蛋白之表達差異可能影響其抗血清免疫反應的疑慮。不過，由本研究所製備之 BaMV CP 抗血清 (RB2025-BaMV 及 RB2026-BaMV) 的高靈敏與特異性反應可得知，細菌表現系統相當適合 BaMV CP 之表現。

本抗血清乃由臺中市大坑地區之 BaMV 分離株的 CP 所製備而來，與 GenBanK 已登錄之 BaMV CP 核苷酸及胺基酸序列相同度之比對顯示均高於 74% 以上，且從血清學試驗資料顯示本研究所製備之抗血清可與臺灣其他區域麻竹、綠竹等竹類作物所分離到的 BaMV 分離株反應良好(資料未顯示)。此外依據 2017 年 Wang 等人⁽¹⁹⁾發表 BaMV 及相關衛星 RNA 系譜學與共同演化之研究顯示 BaMV 親緣關係，資料顯示依據 BaMV 及 satBaMV 的過去進化史，文獻推論假設臺灣海峽一直是中國基

因流動的地理障礙，來自臺灣的大多數分離株形成一個隔離進化枝和那些來自中國的進化枝，兩者之間並無彼此穿插，但其中之一中國進化枝形成了樹的基礎群，此暗示臺灣隔離株起源於中國，因此毫無疑問地，臺灣的 BaMV 分離株最有可能來自中國，而從中國新獲得的 satBaMV 分離株是被發現與先前建立的在印度 Clade III 最為相關⁽¹⁹⁾。綜觀目前已知的 BaMV 各分離株之間鞘蛋白胺基酸序列的差異皆在 5% 以內，應不易產生血清學反應上的區別，顯示本研究所製備的 BaMV 鞘蛋白抗血清 (RB2025-BaMV 及 RB2026-BaMV) 應不僅可適用於臺灣不同 BaMV 分離株之檢測，也許亦可應用於亞洲 (印度及中國) BaMV 分離株的血清法檢測，不過此推論尚需進一步研究證實。

使用本研究製備之 BaMV CP 抗血清 (RB2025-BaMV 及 RB2026-BaMV) 於田間篩選無感染 BaMV 麻竹植株之血清檢測，檢測樣品為 2 個目視葉片出現嵌紋罹病植株樣品及 4 個目視葉片無出現嵌紋病徵之植株樣品 (視為健康植株樣品)，經 indirect ELISA 檢測 (2 抗血清皆稀釋 2,000 倍)，2 件罹病樣品之 ELISA 吸光值平均值為 RB2025-BaMV (2.114, 1.555) 及 RB2026-BaMV (1.438, 1.018)，4 件健康植株樣品之 ELISA 吸光值平均值為 RB2025-BaMV (0.114) 及 RB2026-BaMV (0.110)。同樣的樣品，使用傳統純化病毒方法所製備之抗血清，2 件罹病樣品之 ELISA 吸光值平均值分別為 (3.372, 3.258)，4 件健康植株樣品之 ELISA 吸光值平均值為 0.730。本研究製備之鞘蛋白抗血清則無上述之缺點，應用在 ELISA 進行田間樣品檢測時其反應性、靈敏度及準確性均優於傳統純化病毒方法所製備之抗血清。此一抗體之成功製備對我國竹類作物 BaMV-free 種苗之建立與監測將有實質之助益。

參考文獻

1. 吳信郁、廖高宗、姚瑞禎、葉俊巖 2012 桃園地方種無竹嵌紋病毒綠竹苗繁殖體系建立與推廣 桃園區農業改良場研究彙報 72: 57-65。
2. 陳金枝、鄭櫻慧、黃春惠、江芬蘭、陳麗雯、張清安 2009 利用細菌表現康乃馨斑駁病毒之鞘蛋白製備多元抗體及其檢測應用 植物病理學會刊 18(1): 35-44。
3. 陳袖綿、王筠棋、吳佩儒、陳宗祺 2014 番茄斑點萎凋病毒 (Tomato spotted wilt virus) 核鞘蛋白抗血清製備及其血清學親緣關係之探討 植物保護學會會刊 56(2): 55-74。
4. 張清安 1996 植物病毒鑑定與診斷新技術 p.35-45 植物保護新科技研討會專刊 (臺灣省農業試驗所特刊第 57 號) 行政院農業委員會農業試驗所編印。
5. 詹富智、盧耀村、陳慶忠 2002 植物檢疫病毒偵測技術 p.35-52 植物重要防疫檢疫害蟲診斷鑑定研習會專刊 第二輯 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局編印。
6. 趙佳鴻、沈原民、劉興隆、柯文華、白桂芳 2011 中部地區麻竹病毒害調查 臺中區農業改良場研究彙報 111: 75-90。
7. 鄭安秀、葉忠川 2002 無嵌紋病毒綠竹苗繁殖體系之建立與推廣 植物病理學會刊 11: 169-172。

8. 鄭櫻慧、陳金枝、周建銘、鄧汀欽 2017 作物病毒病害診斷鑑定 2016 設施蔬果病蟲害管理暨安全生產研討會論文集 農業試驗所特刊第 205 號 54-63 頁 台中霧峰。
9. 農業統計年報 2019 行政院農業委員會編印。
10. Elliot, M.S. and F. W. Zettler. 1996. Bamboo mosaic virus detected in ornamental bamboo species in Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 109: 24–25.
11. Lee, C.C., Y.N. Ho, R.H. Hu, Y.T. Yen, Z.C. Wang, Y.C. Lee, Y.H. Hsu and M. Meng. 2011. The interaction between bamboo mosaic virus replication protein and coat protein is critical for virus movement in plant hosts. *Journal of virology* 85: 12022-12031.
12. Lin N. S. and C. C. Chen. 1991. Association of bamboo mosaic virus (BoMV) and BoMV-specific electron-dense crystalline bodies with chloroplasts. *Phytopathology* 81(12): 1551-1555.
13. Lin, N. S., Y. J. Chai, T. Y. Huang, T. Y. Chang and Y. H. Hsu. 1993. Incidence of *Bamboo mosaic potexvirus* in Taiwan. *Plant Dis.* 77(5): 448-450.
14. Lin, N. S., M. J. Chen, T. Kiang and W. C. Lin. 1979. Preliminary studies on bamboo mosaic virus in Taiwan. *Taiwan For. Res. Inst.* 317: 1-10.
15. Lin, N. S., F. Z. Lin, T. Y. Huang and Y. H. Hsu. 1992. Genome properties of Bamboo mosaic virus. *Phytopathology* 82(7): 731-734.
16. Lin, W. W., J. Zhang, W. T. Yang, Y. Y. Liu, B. J. Wan, X. L. Xu and Z. J. Wu. 2015. First Report of *Bamboo mosaic virus* Infecting Bamboo in the Mainland of China. *Plant Disease* 99(8): 1189.
17. Nelson S. and W. Borth. 2011. Bamboo mosaic. Honolulu (HI): University of Hawaii. 4 p. (Plant Disease Series; PD-76).
18. Thomas, J.E. and R. L. Dodman. 1999. The first record of bamboo mosaic potexvirus from Australia. *Australasian Plant Pathology* 28: 337.
19. Wang, I. N., W. B. Yeh and N. S. Lin. 2017. Phylogeography and Coevolution of Bamboo Mosaic Virus and Its Associated Satellite RNA. *Front Microbiol.* 8: 886.

Production of Antiserum Against Coat Protein of *Bamboo mosaic virus* for Virus Detection¹

Chia-Hung Chao², Fang-Lin Liu³, Chao-Jen Wang⁴ and Kuei-Fang Pai⁵

ABSTRACT

The central region of Taiwan is an important production area for Ma bamboo shoots. In recent years, bamboo mosaic virus (BaMV) emerged and caused the shoots quality deterioration and yield loss, and quick spreading of the disease in the production area. In this study, the leaves with mosaic symptoms were collected from the Ma bamboo plants in Dakeng District nursery in Taichung City and tested with the anti-BaMV-CP serum for confirmation of the samples associated with BaMV. Furthermore, the whole genomic RNA the diseased samples was extracted using Plant Total RNA Miniprep Purification Kit. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with the specific primers, designed according to the identified BaMV coat protein (CP) gene in GenBank, was performed to amplify a PCR product with approximately 730 bp size. The Dakeng clone (BaMV-DK) candidate of PCR product was selected and sequenced for confirming the identity and similarity with the sheath protein gene of BaMV from GenBank, and the results showed that more than 72% nucleotide identities and 80% identical of the amino acid were confirmed with the sheath protein gene of BaMV on from GenBan. These results indicated that the BaMV-DK is indeed an isolate of BaMV. Moreover, a large amount of BaMV sheath protein was expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) by the pET system for preparation of a highly specific BaMV antiserum. The purified protein was used to immunize rabbits for producing BaMV multiple antisera (RB2025-BaMV and RB2026-BaMV), which in turn can be used to detect the BaMV-infected samples specifically in fields as a powerful tool for producing BaMV-free seedlings in the future.

Key words: ma bamboo, *Bamboo mosaic virus*, virus detection, bacteria expressed coat protein

¹Contribution No.0988 from Taichung DARES, COA.

^{2,4,5}Associate Researcher, Assistant Researcher and Researcher of Taichung DARES, COA.

³Manager of ID Lab Co., Ltd. Taichung, Taiwan.