

鑑定邊境攔截之 陸蓮花微嵌紋病毒 (*Ranunculus mild mosaic virus*) 及其檢測試劑之製備與應用

陳金枝^{1,*} 廖家翌² 廖敏伶³ 劉逸琪³ 江芬蘭²

摘要

陳金枝、廖家翌、廖敏伶、劉逸琪、江芬蘭。2022。鑑定邊境攔截之陸蓮花微嵌紋病毒 (*ranunculus mild mosaic virus*) 及其檢測試劑之製備與應用。台灣農業研究 71(1):73–86。

本研究鑑定進口陸蓮花 (*Ranunculus asiaticus*) 切花上引起葉片嵌紋微狀之病毒，病葉樣品為行政院農業委員會動植物防疫檢疫局新竹分局於輸入檢疫取樣之荷蘭進口陸蓮花。初步以花卉病毒多元抗體進行間接式酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 檢測，受測樣品均與 potyvirus 單元抗體 (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 產生正反應，並能與 potyvirus 簡併式引子對 [HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎] 於 RT-PCR 反應中產生預估大小約 1.3 kbp 之核酸片段，經選殖與定序鑑定後，乃屬於 *ranunculus mild mosaic virus* (RanMMV) 之核酸序列，並與 GenBank 上已登錄之 RanMMV (Accession No. LC387972) 之鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列有高達 98.6% 以上之相同度，屬相同病毒之分離株。於 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 檢測中，本研究所設計的 RanMMV 引子對 (RanMM-u/RanMM-d) 均可由葉片呈現嵌紋微狀的陸蓮花切花和罹病種球組織檢出 1.04 kbp 之核酸片段產物。進一步將解得之 RanMMV 鞘蛋白核酸序列共 825 個核苷酸以基因合成法構築於 pET28a(+) 表現載體上，再於 *Escherichia coli* BL21 宿主中進行鞘蛋白之誘導 (分子量約 30.5 kDa)，並將其作為抗原以製備 RanMMV 之多元抗體，可成功用於進口陸蓮花切花及種球上對 RanMMV 之檢測。本研究為首次於邊境截獲國外的陸蓮花病毒 RanMMV，國內尚未有此病毒之發生，本研究成功研製之 RanMMV 核酸及免疫檢測技術，將可提升對進口陸蓮花之邊境檢疫效能。

關鍵詞：陸蓮花、馬鈴薯 Y 屬病毒、多元抗體、RT-PCR 檢測。

前言

陸蓮花 (*Ranunculus asiaticus*) 原產於東地中海地區，16 世紀初從土耳其引入西歐；目前廣泛分布於西歐、南非、北美、以色列和日本 (Turina *et al.* 2006; Emadzade *et al.* 2011)；由於其種類多樣、花型及花色美麗，為廣被栽培且深受歡迎的花卉。全球主要產區為荷蘭、以色列和義大利，以種球無性繁殖 (Beruto *et al.* 2018)。

罹染病毒病的陸蓮花，切花品質及產量均會受影響 (Restuccia *et al.* 2011)。國際間已記錄可感染陸蓮花的病毒種類至少 15 種 (Restuccia *et al.* 2011)，包括 broad bean wilt virus 2 (BBWV-2) (Minutolo *et al.* 2016)、cucumber mosaic virus (CMV) (Ushiyama *et al.* 1989; Hayahi *et al.* 2018)、impatiens necrotic spot virus (INSV) (Vaira *et al.* 1997; Restuccia *et al.* 2011)、plum pox virus (PPV) (van Oosten 1970)、potato virus Y (PVY)

投稿日期：2021 年 8 月 25 日；接受日期：2021 年 11 月 30 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計畫助理。台灣 台中市。

³ 農委會動植物防疫檢疫局新竹分局技正。台灣 桃園市。

(Bellardi *et al.* 1988)、ranunculus leaf distortion virus (RanLDV)(Turina *et al.* 2006)、ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) (Wang *et al.* 2008; Minutolo *et al.* 2016; Hayahi *et al.* 2018)、ranunculus mosaic virus (RanMV) (Turina *et al.* 2006; Ciuffo *et al.* 2011)、ranunculus mottle virus (RMV) (Laird & Dickson 1967; Elliott *et al.* 1988)、ranunculus white mottle virus (RWMV) (Vaira *et al.* 1997, 2000)、tomato spotted wilt virus (TSWV) (Lisa *et al.* 1990; Whitfield *et al.* 2003; Hayahi *et al.* 2018)、turnip mosaic virus (TuMV) (Ohshima *et al.* 2002; Restuccia *et al.* 2011)、tobacco necrosis virus (TNV) 和 tobacco rattle virus (TRV) (Restuccia *et al.* 2011)。其中，RanMMV 首次於義大利的陸蓮花上被發現，引起葉片嵌紋，可經由蚜蟲傳播，寄主範圍局限於毛茛科 (Ranunculaceae) (Turnia *et al.* 2006)。在陸蓮花產區中，RanMMV 更是影響陸蓮花生產品質的關鍵病毒 (Restuccia *et al.* 2011; Hayahi *et al.* 2018)。

RanMMV 為 *Potyvirus* 屬病毒之成員，*potyvirus* 病毒型態為長絲狀，病毒顆粒大小約 680–900 nm；具有分子量約 30–47 kDa 的蛋白質外鞘 (coat protein; CP)，其基因體乃由分子量大小約 9.7 kb 的單股正極性 RNA (positive sense ssRNA) 所組成。*Potyvirus* 屬病毒的分類可由病毒顆粒形態、媒介昆蟲種類、血清親緣關係和核酸分子特性等方面鑑定之；近年來依據國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) (<https://talk.ictvonline.org/>) 所公布的 *Potyvirus* 屬病毒分類標準：對於 *Potyvirus* 屬病毒的種 (species) 分類界定，主要依據 (1) 完整基因體的核苷酸 (nucleotide; nt) 序列相同度小於 76%、胺基酸小於 82% 者為不同種之病毒；(2) 若以特定蛋白區域的核苷酸相同度進行比較，於 P1 對應區域小於 58%，而於其他區域小於 74–78% 者為不同種；(3) 針對 CP 核苷酸相同度小於 76–77% 且胺基酸小於 80% 者為不同種之病毒 (Adams *et al.* 2005)。此外，*Potyvirus* 屬病毒也可依據其 3' 端非轉譯區 (3'-noncoding region; 3'-NCR) 之核苷酸序列比對，在高於 80% 相同度者鑑定為相同種的 *potyvirus* 病毒

(Frenkel *et al.* 1989; Van Regenmortel *et al.* 2000)。

台灣主要以進口陸蓮花切花或種球栽培，開花的高峰期為冬季到春季，對於可能隨種球進口而輸入國內之病毒種類，有必要建立自主檢測能力以因應邊境檢疫或監測之需。本研究針對行政院農業委員會動植物防疫檢疫局新竹分局 (以下簡稱防檢局新竹分局) 於邊境所攔截之進口陸蓮花切花和種球所檢出之 *potyvirus* 病毒，進行其分子核酸定序與鑑定，確認其為 RanMMV；進一步設計其核酸檢測用引子對，以及應用細菌合成系統表現 RanMMV 病毒之鞘蛋白作為抗原，成功製備出 RanMMV 多元抗體供免疫檢測用。本研究所開發之核酸或免疫檢測試劑，可應用於邊境檢疫之進口陸蓮花病毒的監測。

材料與方法

材料來源

本研究之試驗樣品來源乃由防檢局新竹分局於 2019–2020 年期間於輸入檢疫時取樣之荷蘭進口 (原產地為義大利) 陸蓮花切花，本試驗以葉片出現有嵌紋徵狀 (mosaic) 者以及進口種球為檢測材料。

以免疫檢測法初步鑑定病毒

由防檢局新竹分局自海關抽樣之陸蓮花切花材料，初步以市售之 *potyvirus* 單元抗體 (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 及實驗室之前已製備之 TuMV、CMV 和 TSWV 等花卉病毒抗體進行間接式酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 檢測，篩選與受測之病毒抗體產生正反應之陸蓮花切花，進行後續之核酸增幅反應及病毒核苷酸定序試驗。

抗血清免疫檢測分析法

Indirect ELISA 法：本試驗參考以往報告進行之 (Clark & Adams 1977; Chang *et al.* 1988; Chen *et al.* 2016)。取 0.1 gm 之受測樣品組織，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 96 孔

ELISA 反應盤內，每樣品加 2 孔 (100 μ L/孔) 為 2 個重複，置於 37°C 定溫 3–4 h 進行覆膜反應 (coating reaction)，然後以 1 \times PBST 緩衝液 (137 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 沖洗 3 次；之後分別加入欲檢測之病毒抗體後，放置在 37°C 定溫箱反應 2 h；爾後以 1 \times PBST 緩衝液沖洗 3 次，再加入已稀釋 6,000 \times 之山羊抗兔二次抗體 (goat anti-rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, USA) (100 μ L/孔)，置於 37°C 定溫箱反應 2 h；最後再以 1 \times PBST 緩衝液沖洗 4 次後，再以 150 μ L/孔之比例加入濃度為 1 mg mL⁻¹ 之鹼性磷酸酶酵基質 (p-NPP) (VWR Life Science, Solon, OH, USA) 進行呈色反應。反應 30 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃度高低之依據。樣品吸光值大於健康葉片 2 倍者，判讀為正反應。

西方墨點法：取 0.1 gm 受測樣品之組織，置於 1.5 mL 微量離心管內，加入液態氮研磨均質，加入 200 μ L 樣品處理液混勻 (Chen *et al.* 2016)，再加入 200 μ L 之 LDS (Laemmli dissociation solution) (Laemmli 1970) 溶液混勻，於沸水中悶熱 3–5 min，以 5,900 \times g 離心 5 min 後取上清液進行電泳分析。樣品經 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳後，取膠體轉漬於 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜 (Immobilion-P; Merck Millipore Ltd., Cork, Ireland) 再與受測之病毒抗體進行反應。

病毒 3' 端核酸片段之增幅、選殖與定序分析

以本研究受測陸蓮花樣品被 potyvirus 單元抗體檢出有反應者，進一步以單步驟反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 進行其 3' 端核酸片段之增幅，將符合預估分子量大小的特定核酸片段產物做選殖後進行核苷酸定序分析，以取得不同病毒分離株之鞘蛋白 (CP) 核酸序列。採用之單步驟 RT-PCR 法反應條件詳述如下。

核酸純化：取 0.1 g 之受測組織，加入液態氮研磨均勻後，依據市售之植物全量核酸萃取試劑組 (Plant Total RNA mini Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corporation, Taipei, Taiwan) 步驟，進行供試植物組織樣品之全量核糖核酸 (total RNA) 萃取。

單步驟 RT-PCR 法：以純化所得之 RNA 為模板，使用可增幅 *Potyvirus* 屬病毒核酸 3' 端 (3'-terminal region) 約 1.3 kbp 之簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ (5'ATGATHGARKCNTGGGG3'/5'GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT3') (Pappu *et al.* 1998; Chen *et al.* 2006) 進行單步驟 RT-PCR 反應。反應條件依據市售 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 DEPC-treated water。所有試劑混合均勻後，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Germany) 中進行。設定反應程序為：50°C 下進行反轉錄 30 min、94°C 變性 2 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 1 min、50°C 下黏合 1 min、72°C 下聚合 1 min，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

核酸片段選殖和核苷酸序列分析：經由引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ 於 RT-PCR 反應中所增幅出預估分子量大小約 1.3 kbp 的核酸片段，選殖於 pGEM-T Easy Vector Systems 載體上 (Promega, Madison, WI, USA)，篩選出含有此特定嵌入序列 (insert sequence) 選殖株送交核酸定序公司 (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., WI, USA) 軟體進行分析，並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) 已登錄的 *Potyvirus* 屬病毒之 CP 核苷酸和胺基酸序列進行比對分析。

RanMMV 之引子對設計與 RT-PCR 檢測罹病組織

依據從陸蓮花罹病材料所選殖定序完成的 RanMMV 分離株 3' 端之 1.3 kbp 之核苷酸序列設計 RT-PCR 檢測用專一引子對，上游引子 RanMMVu (5' GGACAGTTGACTTGGGAGC-TA3')、下游引子 RanMMVd (5' CTGTGATT-GAAAGGT GGGTTCC3')，預估可增幅出產物分子量大小約 1.04 kbp，此片段將可包含全長度 RanMMV-CP 及其兩端核苷酸之序列。取陸蓮花罹病組織，純化其全量核酸作為模板進行單步驟 RT-PCR 反應。設定反應程序為：50°C 下進行反轉錄 30 min、94°C 變性 2 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 1 min、52°C 下黏合 50 s、72°C 下聚合 1 min，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠進行分析判讀結果。

RanMMV-CP 表現蛋白誘導及多元抗體製備

依據 RanMMV 分離株定序結果，選取其全長度 CP 核苷酸序列為模板，委託波仕特生物科技股份有限公司 (台灣台北市) 進行全長度 RanMMV-CP 核苷酸合成，並構築於表現載體 pET28a(+) 之質體上 (Novagen Inc., Madison, WI, USA)，質體代號為 pET-RanMMVCP。所合成之核酸片段，包含有對應全長度 CP 之 825 個核苷酸及 CP 核苷酸終止碼 (TAG)、2 種限制酶切位 (分別為 5' 端之 *NcoI* 和 3' 端之 *XhoI* 切位)。

將 pET-RanMMVCP 質體轉型於 *Escherichia coli* BL21 宿主內，進行 RanMMV-CP 之表現蛋白誘導與純化，相關試驗方法參照以往研究報告進行 (Chen *et al.* 2018)：轉型株以 M9 培養基培養，並以 1 mg mL⁻¹ 之 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質之表現 (Li *et al.* 1998)。培養之菌液以 5,900×g 轉速離心 10 min 後，沉澱物以 0.5 M Tris-EDTA (pH 8.0) 緩衝液溶解均勻，並進行 SDS-PAGE 電泳分析，再經西方墨點法以市售 potyvirus 單元抗體 (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 確認 RanMMV-CP 抗原之表現。

之後，進一步選用已確定有表現 CP 之 pET-RanMMVCP 選殖株進行大量表現蛋白之誘導與純化 (Li *et al.* 1998; Chen *et al.* 2016)，將純化之表現蛋白濃縮為 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 的免疫注射於兔子以製備多元抗體。

RanMMV-CP 多元抗體對不同馬鈴薯 Y 屬病毒之檢測

為評估自製多元抗體之檢測效果，本試驗以 indirect ELISA 法進行測試，選用本研究室以往保存之 15 種不同 *Potyvirus* 屬病毒之罹病組織與自製之 RanMMV-CP 多元抗體進行反應，取 0.1 gm 之受測樣品組織進行之。Indirect ELISA 法檢測步驟詳如前述，樣品吸光值大於健康葉片 2 倍讀值者，判讀為正反應。

RanMMV-CP 多元抗體應用於陸蓮花罹病株之檢測

分別取用 2019–2020 年由防檢局新竹分局於輸入檢疫取樣之陸蓮花切花及種球，採取 0.1 gm 之切花葉片或種球組織，以 indirect ELISA 與自製 RanMMV-CP 多元抗體進行反應，流程詳如前述。另以市售之 potyvirus 單元抗體之檢測結果比較之，以評估本研究之自製多元抗體對陸蓮花罹病材料之檢測效果。

取用以 indirect ELISA 檢出正反應之陸蓮花樣品，進一步於西方墨點法中與 RanMMV-CP 多元抗體進行反應，以評估於西方墨點法檢測陸蓮花罹病材料之效果。

結果

邊境攔截之感染陸蓮花切花的病毒初步鑑定

Indirect ELISA 法：本試驗以 indirect ELISA 法檢測 2019 年首次由防檢局新竹分局於輸入檢疫抽樣之陸蓮花切花材料，受測 21 個樣品均呈現嵌紋徵狀 (圖 1) 且僅與市售之 potyvirus 單元抗體產生正反應 (表 1)，顯示此等切花樣品內存在與 potyvirus 有血清類緣相近的病毒。進一步將切花樣品分為花朵、葉片和花



圖 1. 邊境攔截之進口陸蓮花切花呈現葉片嵌紋病徵，檢出有陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV)。

Fig. 1. Mosaic symptoms on leaves of the border-intercepted ranunculus cut flowers positively detected with ranunculus mild mosaic virus (RanMMV).

莖 3 個部位與 potyvirus 單元抗體反應，結果顯示此 21 個樣本檢出的 potyvirus 病毒呈現不均勻分布 (表 1)，在花莖部位可全數檢出，ELISA 正反應平均讀值 1.508；於花朵部位也是全數檢出，正反應平均讀值 0.630；於葉片部位的檢出數最少，為 12 個，正反應平均讀值 0.295，以上結果顯示採樣花莖為檢測材料，可獲得較高的病毒檢出數與讀值。

RT-PCR 法及 3' 端核酸片段定序分析：將與 potyvirus 單元抗體有正反應之陸蓮花切花組織樣品，進一步以 potyvirus 簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ 以 RT-PCR 增幅其 3' 端核酸片段，均可產生與預估分子量約 1.3 kbp 大小的核酸片段 (圖 2A)，將此等增幅產物做選殖於 pGEM-T 載體並進行核苷酸定序分析，所選殖到的 4 個分離株 (RanMMV 1、2、3、4) 之核酸片段，均具有 potyvirus 3' 端的特性，即含有 poly(A) 尾端，且 CP 核苷酸長度均為 825 nts；且 nuclear inclusion b (NIB) 和 CP 之

表 1. 以間接式酵素連結免疫吸附法檢測進口陸蓮花切花各部位組織之病毒分布。

Table 1. Detection of potyvirus on the different portions of ranunculus cut flowers by indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

Sample ^z	ELISA reading (A _{405nm}) ^y		
	Flower	Leaf	Peduncle
1	0.340	0.140	1.981
2	1.096	0.367	3.174
3	0.589	0.104	2.205
4	0.951	0.210	1.041
5	2.235	0.293	0.828
6	0.352	0.168	1.912
7	0.399	0.133	1.187
8	0.158	0.110	0.255
9	0.464	0.245	2.556
10	0.166	0.106	0.619
11	1.336	0.227	2.461
12	1.355	0.177	1.305
13	0.345	0.158	2.163
14	0.220	0.069	0.338
15	0.342	0.102	0.631
16	1.443	0.107	0.952
17	0.535	0.094	1.103
18	0.122	0.085	0.333
19	0.507	0.110	1.758
20	0.131	1.013	2.655
21	0.157	0.410	2.201
D-CK	3.413	3.413	3.413
2H-CK	0.110	0.110	0.110
No. positive	21	12	21
Av. positive value	0.630	0.295	1.508

^z Tested samples are cut flowers collected from imported *Ranunculus* in 2019.

^y The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) readings lower than twofold healthy control (2H-CK) were considered undetectable by indirect ELISA. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed coat protein of a potyvirus. The monoclonal antibody of potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) was used for detection.

辨識位置均為 VFHQ/A (圖 3)，與 GenBank 上已登錄之 RanMMV (Accession No. LC387972) 相同；CP 核苷酸和胺基酸之相同度均與 RanMMV (Accession No. LC387972) 達 98.6% 以上 (表 2、圖 3)，而 3'-NCR 核苷酸序列相同度也

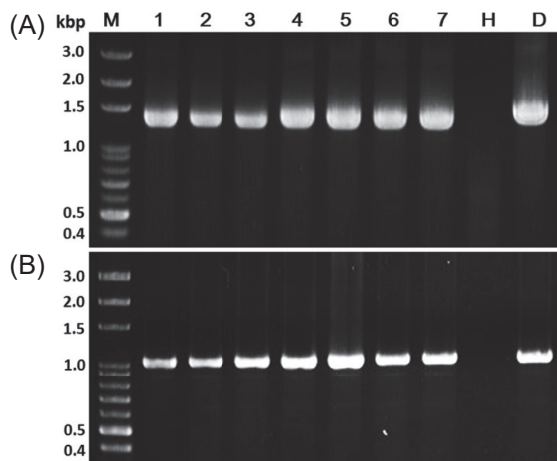


圖 2. 罹染陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 之陸蓮花組織的反轉錄-聚合酶鏈鎖反應電泳圖。分別以 (A) potyvirus 簡併式引子對和 (B) RanMMV 專一性引子對進行之。行 M: 核酸分子量標幟；行 1-7: 陸蓮花 RanMMV 罹病葉組織；行 H: 健康陸蓮花葉組織；行 D: RanMMV 罹病組織正對照。

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA products amplified from reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of the ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) isolate by (A) the primer pairs of potyvirus-degenerate primers and (B) RanMMV specific primers, respectively. Lane M: molecular marker; lanes 1-7: RanMMV-infected tissues; lane H: the healthy control; lane D: the positive control of RanMMV. The predict amplicons of A and B were 1.3 kbp and 1.04 kbp, respectively.

高達 99.5% 以上 (表 2)；但與感染陸蓮花之另一種 potyvirus (ranunculus mosaic virus; RanMV) (Accession No. DQ152192; Turina *et al.* 2006), CP 核苷酸和胺基酸之相同度分別為 60.7% 及 56.4%, 3'-NCR 核苷酸序列相同度則僅為 44.2% (表 2)。依據 *Potyvirus* 屬病毒胺基酸序列特性 (Ward *et al.* 1992; Adams *et al.* 2005), 歸納本研究所得之陸蓮花病毒核酸序列, 均為 *Potyvirus* 屬之 RanMMV。

以自行設計之 RanMMV 引子對和 RT-PCR 檢測罹病組織

本研究依據 RanMMV 分離株的 3' 端 1.3 kbp 之核苷酸序列所設計的 RanMMV_u/RanMMV_d 引子對, 於 RT-PCR 反應中, 分別可

表 2. 邊境攔截之陸蓮花微嵌紋病毒 ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) 分離株與已登錄於 GenBank 之其他 *Potyvirus* 病毒鞘蛋白基因序列分析比對。

Table 2. Percent identities of the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein region of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) isolates to other ranunculus potyviruses available in GenBank.

Virus isolate ^z	Percent identity of ^y		
	CP-nt	CP-aa	3'-NCR
RanMMV (LC387972)	100.0	100.0	100.0
RanMMV (EU684747)	99.8	99.6	99.5
RanMMV 1	99.8	99.6	100.0
RanMMV 2	99.4	98.6	100.0
RanMMV 3	99.4	99.3	100.0
RanMMV 4	99.5	99.6	99.5
RanMV (DQ152192)	60.7	56.4	44.2

^z The sequences of various Ranunculus potyvirus coat protein genes used in this study were obtained from GenBank, including ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) (Accession No. LC387972 & EU684747) and ranunculus mosaic virus (RanMV) (Accession No. DQ152192). Sequences of RanMMV 1-4 were molecularly cloned in this study.

^y Sequences analysis was conducted using of the program of Vector NTI Suite (InforMax Inc., WI, USA).

由陸蓮花切花組織 (圖 2B) 和種球組織 (圖 4), 獲得預估分子量大小約 1.04 kbp 的核酸片段產物；且核苷酸定序結果, 確屬 RanMMV 之序列 (結果未出示)。由 21 個進口種球中, 檢出 7 個帶有 RanMMV, 檢出率約 33.3%。本結果顯示, 所設計的引子對可成功應用於陸蓮花組織的檢測, 尤其是對於進口種球僅採樣其組織仍可檢出此病毒。

陸蓮花 RanMMV-CP 多元抗體之製備與檢測效果

本研究於 *E. coli* 細菌宿主內誘導之陸蓮花 RanMMV-CP 表現蛋白, 為預估包含有對應全長度 CP 之 275 個胺基酸的融合性蛋白 [CP 的 N 端外加有表現載體 pET28a(+) 的 1 個胺基酸], 於 SDS-PAGE 的電泳分析中可見融合性表現蛋白之分子量約為 30.5 kDa, 與預估值相符, 而不含有 RanMMV-CP 核酸的表現載體 pET28a(+) 未偵測到此對應條帶 (圖 5A)。於西方墨點法中, 市售 *Potyvirus* 屬病毒的單元抗體可與 RanMMV-CP 表現蛋白產生正反

	1		60
LC387972	(1)	VFHQANDQNLNAGQQVPSKQKEPQPPGDQTPIQKEPTTSSGKDKDVNVGTAGTFVVPRLN	
RanMMV-1	(1)	VFHQANDQNLNAGQQVPGKQKEPQPPGDQTPIQKEPTTSSGKDKDVNVGTAGTFVVPRLN	
RanMMV-2	(1)	VFHQANDQNLNAGQQVPGKQKEPQPPGDQTPIQKEPTTSSGKDKDVNVGTAGTFVVPRLS	
RanMMV-3	(1)	VFHQANDQNLNAGQQVPGKQKEPQPPGDQTPIQKEPTTSSGKDKDVNVGTAGTFVVPRLN	
RanMMV-4	(1)	VFHQANDQNLNAGQQVPGKQKEPQPPGDQTPIQKEPTTSSGKDKDVNVGTAGTFVVPRLN	
	61		120
LC387972	(61)	AMASKLSLPSVAGKSVMNLNHLLTYNPQQVDLSNTRSTKAQFATWYEGVKADYDVTDEQM	
RanMMV-1	(61)	AMASKLSLPSVAGKSVMNLNHLLTYNPQQVDLSNTRSTKAQFATWYEGVKADYDVTDEQM	
RanMMV-2	(61)	AMASKLSLPSVAGKSVMNLNHLLTYNPQQVDLSNTRSTKAQFATWYEGVKADYDVTDEQM	
RanMMV-3	(61)	AMASKLSLPSVAGKSVMNLNHLLTYNPQQVDLSNTRSTKAQFATWYEGVKADYDVTDEQM	
RanMMV-4	(61)	AMASKLSLPSVAGKSVMNLNHLLTYNPQQVDLSNTRSTKAQFATWYEGVKADYDVTDEQM	
	121		180
LC387972	(121)	AIILNGLMVWCLENGTSPNISGMWVMMEGEEQIEFPIKPLIDHAKPTFRQIMAHFSNVAE	
RanMMV-1	(121)	AIILNGLMVWCLENGTSPNISGMWVMMEGEEQIEFPIKPLIDHAKPTFRQIMAHFSNVAE	
RanMMV-2	(121)	AIILNGLMVWCLENGTSPNISGMWVMMEGEEQIEFPIKPLIDHAKPTFRQIMAHFSNVAE	
RanMMV-3	(121)	AIILNGLMVWCLENGTSPNISGMWVMMEGEEQIEFPIKPLIDHAKPTFRQIMAHFSNVAD	
RanMMV-4	(121)	AIILNGLMVWCLENGTSPNISGMWVMMEGEEQIEFPIKPLIDHAKPTFRQIMAHFSNVAE	
	181		240
LC387972	(181)	AYIEKRNYERPYPMPRYGLQRNLTDMSLARYAFDFYEMTAKTPIRAREAHIQMKAAALRNA	
RanMMV-1	(181)	AYIEKRNYERPYPMPRYGLQRNLTDMSLARYAFDFYEMTAKTPIRAREAHIQMKAAALRNA	
RanMMV-2	(181)	AYIEKRNYERPYPMPRYGLQRNLTDMSLARYAFDFYEMTAKTPIRAREAHIQMKAAALRNA	
RanMMV-3	(181)	AYIEKRNYERPYPMPRYGLQRNLTDMSLARYAFDFYEMTAKTPIRAREAHIQMKAAALRNA	
RanMMV-4	(181)	AYIEKRNYERPYPMPRYGLQRNLTDMSLARYAFDFYEMTAKTPIRAREAHIQMKAAALRNA	
	241		280
LC387972	(241)	NTRMFGLDGNVSTQAEDTERHTTDDVNRNMHTMLGVRNI*	
RanMMV-1	(241)	NTRMFGLDGNVSTQAEDTERHTTDDVNRNMHTMLGVRNI*	
RanMMV-2	(241)	NTRMFGLDGNVSTQAEDTERHTTDDVNRNMHTMLGVRNI*	
RanMMV-3	(241)	NTRMFGLDGNVSTQAEDTERHTTDDVNRNMHTMLGVRNI*	
RanMMV-4	(241)	NTRMFGLDGNVSTQAEDTERHTTDDVNRNMHTMLGVRNI*	

圖 3. 不同陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 分離株之鞘蛋白胺基酸序列比對。

Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences of different ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) isolates. RanMMV 1, 2, 3, and 4 were collected from the imported cut flowers of *Ranunculus asiaticus*; The RanMMV isolate (LC387972) is available in GenBank was used for comparison.

應 (圖 5B)，顯示本研究之 RanMMV-CP 表現蛋白具有 *Potyvirus* 病毒之抗原特性。以表現蛋白為抗原所製備之 RanMMV-CP 多元抗體，可與其同源的 RanMMV-CP 表現蛋白產生正反應 (圖 5C)。

以 indirect ELISA 法評估 RanMMV-CP 多元抗體檢測陸蓮花罹病組織和其他來源的 potyvirus 受測樣品的效果上，RanMMV-CP 多元抗體對於其細菌表現之鞘蛋白同源抗原 (D-CK) 及 RanMMV 罹病組織均具有高於 1.5 的

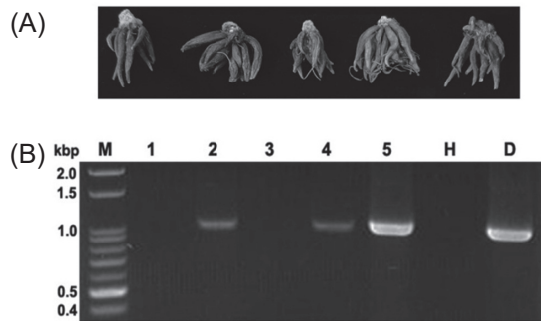


圖 4. 以陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 專一引子對進行陸蓮花種球組織之反轉錄-聚合酶鏈鎖反應的電泳圖；(A) 陸蓮花種球和 (B) 電泳圖。罹染 RanMMV 者可檢出 1.04 kbp 之核酸片段產物。行 M：核酸分子量標幟；行 1-5：進口陸蓮花種球；行 H：健康陸蓮花葉組織；行 D：RanMMV 罹病組織正對照。

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA products of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) amplified from ranunculus bulbs in reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with the RanMMV specific primers. (A) The picture showed ranunculus bulbs and (B) RT-PCR amplicons; The 1.04-kbp amplicons were detected from those RanMMV-infected bulbs. Lane M: molecular marker; lanes 1-5: ranunculus bulbs; lane H: the healthy control; lane D: the positive control of RanMMV; The predict amplicons was 1.04 kbp.

正反應讀值 (表 3)，與其他受測的 potyvirus 罹病組織反應結果僅與 gomphocarpus mosaic virus (GoMV)、TuMV-YC5、bean common mosaic virus (BCMV)-BICM、zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) 和 papaya ringspot virus (PRSV) 有正反應，且讀值僅介於 0.3-0.7 之間，顯示 RanMMV-CP 多元抗體雖對其他的 potyvirus 也具有檢測效力，但仍以與同源之 RanMMV 反應值較高 (表 3)。

RanMMV-CP 多元抗體與防檢局於 2019-2020 年期間由輸入檢疫取樣的陸蓮花葉片嵌紋罹病材料或種球組織的讀值均為正反應值，介於 0.86-3.01 間 (表 4)，且其對檢出有病毒的正反應樣品數，與市售的 potyvirus 抗血清所檢出者相同 (表 4)；進一步以西方墨點法檢測發現此多元抗體也可與陸蓮花 RanMMV 罹病樣品產生正反應條帶 (圖 6)。

由上述結果顯示自製之 RanMMV-CP 多元抗體於上述兩種免疫檢測法中，皆可成功檢測

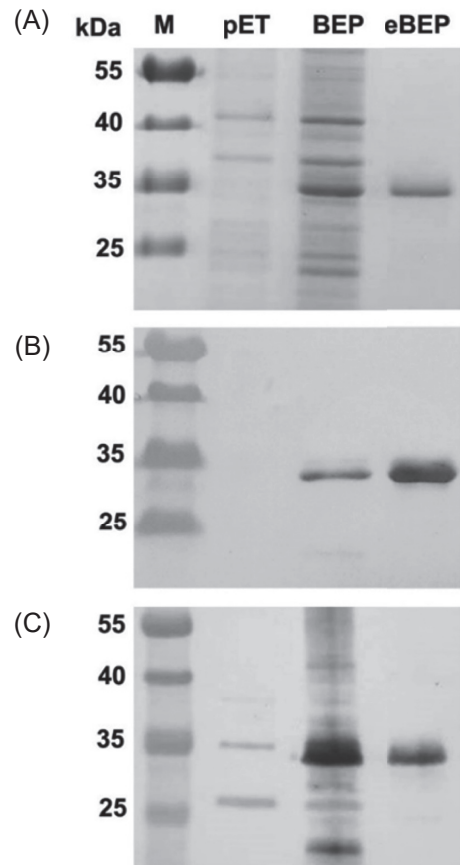


圖 5. 應用細菌大量表現的陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 分離株融合性表現蛋白之 SDS-PAGE 及西方墨點法分析。(A) RanMMV 融合性表現蛋白 (30.5 kDa) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與 (B) Agdia 公司出品之 potyvirus 單元抗體和 (C) 自製之 RanMMV 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：未帶有病毒鞘蛋白之細菌載體 pET28a(+); 行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白。

Fig. 5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV). (A) A 30.5-kDa bacterial-expressed fusion protein of RanMMV-CP was observed in the SDS-PAGE assay. The tested samples were reacted with (B) the purchased monoclonal antibody of potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA), and (C) the polyclonal antibody of RanMMV-CP prepared in this study. Lane M: protein markers; lane pET: IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28a(+) without RanMMV-CP insert; lane BEP: IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with RanMMV-CP insert; lane eBEP: the purified bacterial-expressed RanMMV-CP.

表 3. 利用細菌表現之陸蓮花微嵌紋病毒 ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) 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法檢測不同 *Potyvirus* 病毒之效果。

Table 3. Detection efficiency of the polyclonal antibodies produced with bacterial expressed fusion coat protein of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) by indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

Sample ^z	ELISA reading (A_{405nm}) ^y	
	Agdia-Potyvirus	Anti-RanMMVCP
Ranunculus mild mosaic virus (RanMMV)		
RanMMV 1	1.425	1.630
RanMMV 2	2.389	2.496
RanMMV 3	1.501	2.095
RanMMV 4	2.384	2.090
gompnocarpus mosaic virus (GoMV)	0.838	0.682
turnip mosaic virus (TuMV)-YC5	0.853	0.465
East Asian passiflora virus (EAPV)	1.098	0.098
telosma mosaic virus (TeMV)	1.292	0.110
soybean mosaic virus (SMV)	0.084	0.128
potato virus Y (PVY)-potato	0.075	0.117
bean yellow mosaic virus (BYMV)	0.351	0.131
bean common mosaic virus (BCMV)-BICM	2.718	0.621
gloriosa stripe mosaic virus (GSMV)	0.125	0.188
lily mottle virus (LMOV)	0.923	0.172
zantedeschia mild mosaic virus (ZaMMV)	1.535	0.258
zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	1.869	0.348
ornithogalum mosaic virus (OrMV)	0.826	0.153
papaya ringspot virus (PRSV)	2.514	0.403
lycoris potyvirus	0.132	0.244
D-CK	2.292	2.284
2H-CK	0.098	0.112

^z Tested potyviruses are preserved diseased materials in the laboratory.

^y The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) readings lower than twofold healthy control (2H-CK) were considered undetectable. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed viral protein. The monoclonal antibody of potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) was used for comparison.

到同源抗原 RanMMV，也可應用於陸蓮花上對相同病毒的檢測。

討論

本研究以核酸分子生物技術和血清學方法鑑定由邊境輸入檢疫取樣之進口陸蓮花切花與種球，首次成功鑑定其帶有屬於馬鈴薯 Y 屬病毒 (*Potyvirus*) 成員的 RanMMV，而此病毒目前在台灣並未有發生紀錄，為邊境檢疫攔截到的病毒。本研究利用所攔截之罹病材料，進行 RanMMV 核酸檢測用引子對之設計，以及針

對此病毒鞘蛋白進行多元抗體之製備與應用，成功建立 RanMMV 的檢測技術，用於強化對此病毒的邊境監測。

國際間的陸蓮花栽培產區普遍發生有 RanMMV，台灣目前尚未有此花卉的商業產區，僅由業者零星由國外進口切花或少量種球栽種。惟透過花卉材料之進口，有容易將國外已發生的病毒引入國內的風險，極需建立可靠的檢測技術，用於強化病毒的邊境監測。採用病毒核酸檢測及序列比對做鑑定，可獲得較穩定而正確的病毒檢測結果 (Ward *et al.* 1992; Adams 2005; Gibbs & Ohshima 2010)，尤其針

表 4. 利用細菌表現之陸蓮花微嵌紋病毒 ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) 鞘蛋白所製備的多元抗體於間接式酵素連結免疫吸附法檢測邊境攔截之陸蓮花罹病組織之效果。

Table 4. Detection of the border-intercepted ranunculus samples with polyclonal antibodies produced with bacterial expressed fusion coat protein of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) in indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

Sample ^z	ELISA reading (A_{405nm}) ^y	
	Anti-potyvirus ^x	Anti-RanMMVCP
108-1	2.770	2.698
108-2	3.114	2.784
108-3	2.697	2.499
108-4	1.953	2.056
108-5	2.643	2.698
108-6	2.475	2.333
108-7	2.860	2.709
108-8	0.775	1.255
108-9	3.176	2.865
108-10	1.648	2.075
108-11	3.335	3.013
108-12	2.970	2.804
108-13	0.949	1.405
108-14	0.703	1.548
108-15	2.488	2.402
108-16	1.720	1.958
108-17	2.537	2.438
108-18	0.589	0.860
108-19	2.670	2.594
108-20	3.006	2.795
108-21	2.612	2.546
109-1	3.003	2.022
109-2	1.957	2.654
109-3	3.312	1.163
109-4	1.374	2.517
109-5	3.134	2.113
109-6	1.605	1.982
D-CK	3.595	3.210
2H-CK	0.060	0.101

^z Tested samples are collected from imported cut flowers (108-1–108-21) and bulbs (109-1–109-6) of ranunculus in 2019 and 2020.

^y The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) readings lower than twofold healthy control (2H-CK) were considered undetectable. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed coat protein of RanMMV.

^x The monoclonal antibody of potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) was tested for comparison.

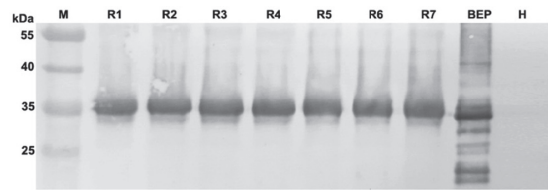


圖 6. 利用細菌表現之陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 抗血清於西方墨點法檢測陸蓮花罹病組織。行 M：蛋白質分子量標幟；行 R1–R7：罹染 RanMMV 之陸蓮花組織；行 BEP：細菌表現之 RanMMV 鞘蛋白；行 H：健康陸蓮花組織。

Fig. 6. Western blotting test of antiserum against bacterial expressed coat protein of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) and the virus-infected ranunculus tissues imported from Netherland. Samples were reacted to the 1,000 \times -diluted antiserum against RanMMV. Lane M: protein marker; lanes R1–R7: virus-infected ranunculus tissues; lane BEP: the lysate of bacteria expressed RanMMV-CP; lane H: healthy tissue of ranunculus.

對邊境檢疫或是新入侵病毒，可快速進行分子鑑定以掌握病毒對象，並能及時處理境外移入的病毒，若再搭配免疫檢測分析，則可處理大量監測樣品的需求。本研究首次針對 2019 年防檢局新竹分局由邊境輸入檢疫取樣的陸蓮花切花材料攔截到境外花卉病毒，初步以市售的 potyvirus 單元抗體及其他國外報導感染陸蓮花的病毒抗體 (包括 CMV、TuMV 和 TSWV)，在葉片出現嵌紋徵狀的陸蓮花切花以 indirect ELISA 法篩檢到 potyvirus，進一步以 potyvirus 簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎ 進行 RT-PCR 增幅，由選殖到的病毒 3' 端約 1.3 kbp 核酸片段定序結果顯示所選殖到的病毒 CP 核苷酸和胺基酸、3'-NCR 核苷酸等序列與已知的 RanMMV 有高於 98.6% 以上的相同度 (表 2、圖 3)，此分子鑑定結果顯示所攔截到的陸蓮花樣品上帶有馬鈴薯 Y 屬成員 RanMMV；後續依據所獲得之 RanMMV-CP 序列進行細菌表現，以融合性蛋白為抗原，所製備成的多元抗體也能與罹病樣品產生正反應，此更證實陸蓮花罹染有 RanMMV，此外，陸蓮花葉片出現的嵌紋徵狀也與國外報導之 RanMMV 引致之病徵相符 (Wang *et al.* 2008; Hayahi *et al.* 2018)。

血清學為鑑定 *Potyvirus* 屬病毒的分類方法之一 (Moghal & Francki 1976)，惟病毒多

元抗體於血清反應中容易有非專一性的結果 (Shepard *et al.* 1974; Shukla *et al.* 1989; Jordan & Hammond 1991; Souiri *et al.* 2014)，也因此提供了廣效性檢測不同病毒的可能性。本研究參照所選殖的 RanMMV-CP 核苷酸序列，構築於表現載體 pET28a(+), 於 *E. coli* 生合成系統誘導產生的融合蛋白顯示帶有 RanMMV 的抗原特性 (圖 5)，以此表現蛋白為抗原製備完成的多元抗體，可應用於 indirect ELISA 和西方墨點法等免疫檢測法檢測 RanMMV (表 3、表 4、圖 6)，除針對同源病毒的檢體外，也與 GoMV、TuMV-YC5、BCMV-BICM、ZYMV 和 PRSV 等 Potyvirus 罹病組織有介於 0.3–0.7 的正反應讀值 (表 3)，顯示 RanMMV-CP 多元抗體對其他 potyvirus 亦具有廣效性檢測效力，但仍以對同源的 RanMMV 有較高的檢測讀值 (表 3)。

RanMMV 在陸蓮花切花上的分布，依 indirect ELISA 法檢測花莖可獲得最高的病毒檢出率及 ELISA 讀值，高於花朵和葉片之檢測結果 (表 1)，此結果顯示 RanMMV 在陸蓮花上的分布不均，因此取花莖樣本進行病毒檢測可獲得較高的準確度。陸蓮花以種球分芽球繁殖，直接採取陸蓮花種球組織進行檢測，也可檢出病毒 (表 4、圖 4)，因此對於進口種球的病毒監測，可先行取樣種球組織以檢測病毒確保種球的健康度，此將可避免病毒隨種球進口而傳入國內，也可預防病毒隨種球無性繁殖而大量散布之風險。

本研究製備之陸蓮花病毒核酸檢測用引子對及其多元抗體，均能有效地檢測到 RanMMV 病毒，此系統之建立將可強化對陸蓮花進口材料邊境檢疫之自主檢測效能。

引用文獻

- Adams, M. J., J. F. Antoniw, and C. M. Fauquet. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch. Virol.* 150:459–479. doi:10.1007/s00705-004-0440-6
- Bellardi, M. G., A. Bertaccini, and F. Marini. 1988. A PVY isolate infecting *Ranunculus*. *Phytopath. Medit.* 27:157–162.
- Beruto, M., M. Rabaglio, S. Viglione, M. C. Van Labeke, and E. Dhooghe. 2018. *Ranunculus*. p.649–671. in: *Ornamental Crops*. Vol. 11. (Van Huylenbroeck, J. ed.) Springer. Cham, Switzerland. 887 pp.
- Chang, C. A., E. Hiebert, and D. E. Purcifull. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyvirus. *Phytopathology* 78:1266–1275. doi:10.1094/Phyto-78-1266
- 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. doi:10.6156/JTAR/2016.06502.09 (in Chinese with English abstract)
- Chen, C. C., F. L. Chiang, and C. H. Huang. 2018. Molecular and serological identification of *Gloriosa stripe mosaic virus* on Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook). *J. Taiwan Agric. Res.* 67:229–246. doi:10.6156/JTAR.201809_67(3).0001 (in Chinese with English abstract)
- Ciuffo, M., M. Testa, R. Lenzi, and M. Turina. 2011. *Ranunculus latent virus*: A strain of *Artichoke latent virus* or a new macluravirus infecting artichoke? *Archi. Virol.* 156:1053–1057. doi:10.1007/s00705-011-0949-4
- 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.* 34:475–485. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475
- Elliott, M. S., F. W. Zettler, M. Gallegati, and N. J. Ko. 1988. A potyvirus infecting *Ranunculus asiaticus*. *Acta Hort.* 234:39–43. doi:10.17660/ActaHortic.1988.234.3
- Emadzade, K., B. Gehrke, H. Peter Linder, and E. Hörandl. 2011. The biogeographical history of the cosmopolitan genus *Ranunculus* L. (*Ranunculaceae*) in the temperate to meridional zones. *Mol. Phylogenet. Evol.* 58:4–21. doi:10.1016/j.ympev.2010.11.002
- Frenkel, M. J., C. W. Ward, and D. D. Shukla. 1989. The use of 3' non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: Application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N. *J. Gen. Virol.* 70:2775–2783. doi:10.1099/0022-1317-70-10-2775
- Gibbs, A. and K. Ohshima. 2010. Potyviruses and the digital revolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:205–

223. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114404
- Hayahi, S., Y. Matsushita, Y. Kanno, Y. Kushima, S. Teramoto, and M. Takeshita. 2018. Field survey of ranunculus mild mosaic virus, tomato spotted wilt virus and cucumber mosaic virus infections in *Ranunculus asiaticus* L. in Japan by newly developed multiplex RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 150:205–212. doi:10.1007/s10658-017-1268-8
- Jordan, R. and J. Hammond. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 72:25–36. doi:10.1099/0022-1317-72-1-25
- Laemmler, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. doi:10.1038/227680a0
- Laird, E. F. and R. C. Dickson. 1967. Ranunculus mottle virus; field incidence and insect vector relationships at Ponto, California. *J. Econ. Entomol.* 60:10–13. doi:10.1093/jee/60.1.10
- Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of dasheen mosaic virus (Caladium isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. *Arch. Virol.* 143:2461–2469. doi:10.1007/s007050050476
- Lisa, V., A. M. Vaira, R. G. Milne, E. Luisoni, and S. Rapetti. 1990. Tomato spotted wilt virus in cinque specie coltivate in Liguria. *Inf. Fitopatol.* 40:34–41.
- Minutolo, M., R. Sorrentino, V. Masenga, and D. Alioto. 2016. First report of *Broad bean wilt virus 2* and *Ranunculus mild mosaic virus* in *Ranunculus asiaticus* in Southern Italy. *Plant Dis.* 100:235. doi:10.1094/PDIS-05-15-0563-PDN
- Moghal, S. M. and R. I. B. Francki. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. *Virology* 73:350–362. doi:10.1016/0042-6822(76)90396-2
- Ohshima, K., Y. Yamaguchi, R. Hirota, T. Hamamoto, K. Tomimura, Z. Tan, T. Sano, F. Azuhata, J. A. Walsh, J. Fletcher, J. Chen, A. Gera, and A. Gibbs. 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen. Virol.* 83:1511–1521. doi:10.1099/0022-1317-83-6-1511
- Pappu, S. S., H. R. Pappu, C. A. Chang, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. *Plant Dis.* 82:1121–1125. doi:10.1094/PDIS.1998.82.10.1121
- Restuccia, P., G. Mancini, A. Bertaccini, and M. G. Belardi. 2011. Recent findings of viruses infecting *Ranunculus* hybrids in Liguria (Italy). *Acta Horti.* 901:113–117. doi:10.17660/ActaHortic.2011.901.14
- Shepard, J. F., G. A. Secor, and D. E. Purcifull. 1974. Immunochemical cross-reactivity between the dissociated capsid proteins of PVY group plant viruses. *Virology* 58:464–475. doi:10.1016/0042-6822(74)90081-6
- Shukla, D. D., J. Jilka, M. Tosic, and R. E. Ford. 1989. A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity purified polyclonal antibodies directed towards virus-specific N termini of coat proteins. *J. Gen. Virol.* 70:13–23. doi:10.1099/0022-1317-70-1-13
- Souiri, A., M. Zenzami, S. Amzazi, and M. M. Ennaji. 2014. Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. *Eur. J. Sci. Res.* 123:281–295.
- Turina, M., M. Ciuffo, R. Lenzi, L. Rostagno, L. Mela, E. Derin, and S. Palmano. 2006. Characterization of four viral species belonging to the family *Potyviridae* isolated from *Ranunculus asiaticus*. *Phytopathology* 96:560–566. doi:10.1094/PHTO-96-0560
- Ushiyama, T., K. Hanada, Y. Honda, N. Aono, and M. Kameyama. 1989. Some viruses isolated from summer phlox, ranunculus and petunia plants. *Bull. Kanagawa Horti. Exp. Sta.* 38:43–49. (in Japanese with English abstract).
- Vaira, A. M., R. G. Milne, G. P. Accotto, E. Luisoni, V. Masenga, and V. Lisa. 1997. Partial characterization of a new virus from ranunculus with a divided RNA genome and circular supercoiled thread-like particles. *Archi. Virol.* 142:2131–2146. doi:10.1007/s007050050231
- Vaira, A. M., M. Vecchiati, V. Lisa, and R. G. Milne. 2000. First report of anemone plants infected by *Ranunculus white mottle virus*. *Plant Dis.* 84:1046. doi:10.1094/PDIS.2000.84.9.1046B
- van Oosten, H. J. 1970. Herbaceous host plants for the sharka (plum pox) virus. *Neth. J. Plant Pathol.* 76:253–260.
- Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Farquet, D. H. C. Bishop, E. B. Cartens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner. 2000. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Academic Press. San Diego, CA. 1162 pp.
- Wang, J. H., S. Zhao, and X. M. Yang. 2008. First report of *Ranunculus mild mosaic virus* on *Ranunculus asiaticus* in Yunnan Province, China. *Plant Dis.* 92:1585. doi:10.1094/PDIS-92-11-1585A
- Ward, C. W., N. M. McKern, M. J. Frenkel, and D. D. Shukla. 1992. Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. *Arch. Virol. Suppl.*

5:283–297. doi:10.1007/978-3-7091-6920-9_29
Whitfield, A. E., L. R. Campbell, J. L. Sherwood, and
D. E. Ullman. 2003. Tissue blot immunoassay for

detection of *Tomato spotted wilt virus* in *Ranunculus asiaticus* and other ornamentals. *Plant Dis.*
87:618–622. doi:10.1094/PDIS.2003.87.6.618

Identification of Ranunculus Mild Mosaic Virus on *Ranunculus asiaticus* Collected from Border Intercepted Ranunculus and the Development and Application of the Virus Detection Reagents

Chin-Chih Chen^{1*}, Jia-Yi Liao², Ming-Ling Liao³, Yu-Chi Liu³, and Fen-Lang Chiang²

Abstract

Chen, C. C., J. Y. Liao, M. L. Liao, Y. C. Liu, and F. L. Chiang. 2022. Identification of ranunculus mild mosaic virus on *Ranunculus asiaticus* collected from border intercepted ranunculus and the development and application of the virus detection reagents. *J. Taiwan Agric. Res.* 71(1):73–86.

Ranunculus asiaticus cut flowers with mosaic symptoms imported from The Netherlands were intercepted by quarantine at the border customs. The potential causal agents were identified and the detection tools were developed in this study. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) was performed with various antibodies against different ornamental viruses preserved in the laboratory. All the tested samples were positively reacted with the commercial potyvirus monoclonal antibody (produced by Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) and could be positively detected with the potyvirus-degenerated primers (HRP-5/Oligo-dT₍₁₄₎) to amplify a 1.3-kbp amplicon in reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCRs). Sequencing data showed the nucleic acid sequences of the amplified amplicons were similar to that of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV). Both of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the cloned cDNA shared more than 98.6% identities with that of RanMMV coat protein gene (GenBank Accession No. LC387972) indicating the intercepted virus is a RanMMV isolate. The further designed RanMMV primer pair (RanMM-u/RanMM-d) can effectively detect the RanMMV on imported mosaic cut flowers and bulb tissues of *R. asiaticus*, and generate a predicted 1.04 kbp amplicon. The cDNA of the RanMMV coat protein open reading frame (CP ORF), containing 825 nucleotides, was constructed in the expression vector of pET28a(+) by artificial gene synthesis, and then the fusion protein (approximately Mt. 30.5 kDa) was expressed in the *Escherichia coli* BL21 host. The resulting RanMMV coat protein was used as an antigen to prepare a polyclonal antibody against RanMMV. The produced polyclonal antibody against RanMMV can successfully detect RanMMV on the imported *R. asiaticus* in immunoassays. RanMMV has not been found in Taiwan and this is the first interception case of the virus at the border. The detection reagents of RanMMV have been successfully developed in this study which might be helpful in improving the efficiency of border quarantine and inspection on imported *Ranunculus* materials.

Key words: *Ranunculus asiaticus*, Potyvirus, Polyclonal antibody, RT-PCR detection.

Received: August 25, 2021; Accepted: November 30, 2021.

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

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

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

³ Technical Specialists, Hsinchu Branch, Bureau of Animal and Plant Healthy Inspection and Quarantine, Taoyuan, Taiwan, ROC.