

感染大王仙丹之番茄嵌紋病毒分離株之鑑定 與特性分析

蔡佳真¹ 陳滄海^{2,3} 張清安^{1,3}

¹ 台中縣霧峰鄉 朝陽科技大學生化科技研究所

² 屏東縣內埔鄉 國立屏東科大學植物保護系

³ 聯絡作者，電子郵件：cachang@cyut.edu.tw；傳真：+886-4-2330-4921；

thchen@mail.npust.edu.tw；傳真：+886-8-774-0293

接受日期：中華民國 97 年 3 月 18 日

摘要

蔡佳真、陳滄海、張清安. 2008. 感染大王仙丹之番茄嵌紋病毒分離株之鑑定與特性分析. 植病會刊 17: 143-155.

王仙丹 (*Ixora duffii* cv. 'Super King')，為台灣普遍栽培之觀賞植物，其繁殖主要以無性扦插方式為之。1994 年吾等於屏東內埔地區發現部份大王仙丹葉片出現疑似病毒所引起之嵌紋病徵。經調查此類病徵可於田間全年發現，但以夏季多雨季節中所新生之枝條與葉片上最為明顯。以電子顯微鏡檢查其葉片汁液發現有硬桿狀病毒顆粒存在，但利用傳統磷酸緩衝液研磨病組織並無法成功接種至其他植物。本研究修改 Chagas 等人所報告之緩衝液配方，成功將上述嵌紋病徵葉片以機械接種法接種於紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 及奎藜 (*C. quinoa* Willd.) 引發局部病斑反應，並將單一病斑重複接種分離獲得一分離株 (BNL)。電子顯微鏡觀察證實 BNL 分離株具硬桿狀病毒顆粒，與田間大王仙丹病葉中所觀察者類似。測定 BNL 分離株之熱不活化溫度為 65-70 °C，耐稀釋度為 10⁹-10¹⁰，冷凍 (-70 °C) 及室溫 (24 °C) 下保存逾 14 個月仍能維持感染力。將 BNL 機械接種於 19 科 69 種植物，有 7 科 34 種會受到感染，茄科植物中多數煙草與番茄均可引發系統性感染造成嵌紋病徵。本研究以奎藜接種的病葉為材料，經高低速交替離心及硫酸銨密度梯度離心獲得純化之病毒顆粒，其鞘蛋白基本單位 (coat protein subunit) 之分子量經電泳分析估算約為 17.5 kDa。以純化之 BNL 病毒顆粒所製備之專一性抗體於免疫擴散反應 (SDS-immunodiffusion test)、西方轉漬 (western blotting) 及間接酵素連結免疫分析法 (indirect ELISA) 下與同源 BNL 抗原及 *Tomato mosaic virus* (ToMV) 抗原可產生強烈反應，但對於 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) 與 *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) 等 tobamoviruses 抗原則反應微弱。利用 ToMV 之專一性引子對 (P10113/P10114) 可由感染 BNL 之奎藜及純化病毒之全量 RNA 經反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 增幅出一段符合預期之 480 bp 核酸產物。此產物經解序後證實其核苷酸序列與已登錄之 ToMV 鞘蛋白核苷酸序列相同度達到 97.7-99.0%，胺基酸序列相同度亦高達 97.5-98.8%，顯示本研究自大王仙丹所分離之 BNL 應為 ToMV 之一種分離株。利用 RT-PCR 及西方轉漬法可由田間呈現嵌紋病徵之大王仙丹病葉與幼根組織中穩定偵測到 ToMV-BNL 之訊號，顯示 ToMV 確實可感染大王仙丹並於其組織內呈現系統性感染。此乃證實大王仙丹為 ToMV 之自然界寄主 (natural host) 之首度報導。

關鍵詞：大王仙丹、病毒鑑定、番茄嵌紋病毒

緒 言

大王仙丹 (*Ixora duffii* cv. 'Super King') 為茜草科 (Rubiaceae)，仙丹花屬 (*Ixora*) 之常綠灌木，原產於西太平洋加羅林群島 (Caroline Islands) 及密克羅尼西亞 (Micronesia)，是仙丹花類中最大的品種。大王仙丹由於花色豔麗、開花期長、病蟲害少、栽培容易，為台灣中南部普遍栽培之觀賞花木⁽⁴⁾。有關仙丹花病毒病害之研究甚少，文獻記錄 Waterworth 及 Povish 曾在 1972 年由菲律賓出口至美國的仙丹花上分離出胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)，稱其為 CMV 仙丹分離株 (CMV-Ix)⁽¹⁴⁾。1994 年，本研究室於屏東縣內埔鄉發現大王仙丹葉片上出現嵌紋等疑似病毒病害之病徵，且與 Waterworth 及 Povish⁽¹⁴⁾ 所述者類似。病葉粗汁液經由電子顯微鏡初步檢查，確實發現有短硬桿狀之病毒粒子存在，但利用奎藜幾經接種分離，皆未能成功。2004 年 3 月，筆者等將大王仙丹嵌紋病株再行接種於奎藜並成功分離獲得一個分離株，稱其為 BNL 分離株。本文乃就 BNL 分離株之寄主範圍與反應、顆粒形態、血清學特性及鞘蛋白分子量及基因序列等特性加以釐清；同時並建立此病毒之檢測技術以供後續病害研究及種苗檢疫之用。

材料與方法

田間疑似病毒病徵之大王仙丹發生率調查

本研究選定嘉義市、高雄市、屏東縣市等地區，自 2002 年 10 月至 2004 年 10 月，每三個月定期以目視法實地逢機調查大王仙丹出現疑似病毒病徵之比率，同時採集呈現嵌紋、脈綠、皺縮及輪點等明顯病毒病徵植株之枝條作為插穗，帶回溫室扦插成苗，作為後續試驗之材料。

大王仙丹病毒病徵周年變化調查

將採自田間並扦插成活之 95 盆具疑似病毒病徵之大王仙丹種植於溫室內，自 2002 年 10 月至 2005 年 3 月每月中旬調查葉部病徵變化情形。並採取葉片接種於紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 及奎藜 (*C. quinoa*)，同時以電子顯微鏡觀察可能含有之病毒顆粒。

病毒之來源與分離

以上述 95 株採自各地田間之大王仙丹作為病毒分離之來源，逢機自頂梢往下摘取具有典型嵌紋病徵之第一及第四對葉序的葉片及幼根，參考 Chagas *et al.*⁽⁴⁾

所敘述之配方加以修改，將病組織以液態氮研磨再加入 10 倍量內含有 2% (w/w) nicotine 的 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4)，並在接種前即時加入 20 % (w/w) sucrose、0.3 % (w/w) charcoal 及 0.1 M ascorbic acid，均勻混合後機械接種於已撒佈金剛砂之紅藜及奎藜葉片上，待葉片出現局部性斑點，則挑取單一病斑再接種於奎藜，如此重複接種分離 7 次，以獲得純系病毒分離株，該分離株則保存於奎藜或將其葉片儲藏於 -70 °C 下作為後續試驗之材料。

寄主範圍測試

將分離之純系病毒機械接種於 19 科 69 種供試植物 (表一)，置於溫室內連續觀察至少 4 週以上並記錄病徵表現情形。所接種之植物無論有否出現病徵，均分別採取其接種葉及未接種之新生葉片，回接於奎藜，以確認病毒感染情形。

病毒生體外物理性質測定

以接種病毒分離株之奎藜病葉為材料，將其以 10 倍量之 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 研磨成汁液，參照 Dijkstra and de Jager⁽⁴⁾ 之方法，進行熱不活化溫度 (Thermal inactivation point, TIP)、耐稀釋度 (Dilution end point, DEP) 及 24 °C 室溫和 -70 °C 之耐保存性 (Longevity *in vitro*, LIV) 試驗。

電子顯微鏡的觀察

取供試病葉或純化病毒之懸浮液，將其吸附於覆有支持膜之銅網 (grid) 上，經 2 % 醋酸鈾 (uranyl acetate) 陰染，利用穿透式電子顯微鏡 (Hitachi, H-7500) 觀察病毒粒子形態，並測量至少 100 個病毒顆粒以估計其大小。

病毒純化及抗血清之製備

以接種病毒分離株之奎藜病葉為純化材料，參考 Gooding 及 Hebert⁽⁶⁾ 之方法以高低速交替離心法獲得部分純化病毒，後續再以硫酸銨平衡離心法於 38000 rpm (Hitachi, RPS40T rotor) 下離心 18 小時，吸取反光之病毒層，於 4 °C 下以 0.05 M (pH 7.5) 磷酸鉀緩衝液透析隔夜，即為完全純化之病毒，其收量依 Dijkstra and de Jager⁽⁴⁾ 所述之方法估算病毒濃度。

為製備專一性抗體，將純化病毒 (2 mg/ml) 以皮下注射方式施打於約 2 kg 之紐西蘭白兔，每週注射一次，第一次注射將 0.5 ml 純化病毒與等量之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 乳化，之後三次追加注射

表一、由大王仙丹所分離之番茄嵌紋病毒(*Tomato mosaic virus*) BNL 分離株之寄主植物反應Table 1. Host reactions of BNL isolate of *Tomato mosaic virus* isolated from *Ixora* (Super King)

Family and species of test plant	Symptoms ¹		Back inoculation ²	
	Inoculated leaf	Systemic leaf	Inoculated leaf	Systemic leaf
Aizoaceae (番杏科)				
<i>Tetragonia tetragonoides</i> (番杏)	NL	-	+	-
Amaranthaceae (莧科)				
<i>Amaranthus paniculatus</i> (莧菜)	-	-	-	-
<i>Celosia argentea</i> (雞冠花)	-	-	-	-
<i>Gomphrena globosa</i> (千日紅)	NL	D	+	+
Apocynaceae (夾竹桃科)				
<i>Vinca rosea</i> (日日春)	-	-	-	-
Asteraceae (菊科)				
<i>Chrysanthemum coronarium</i> (茼蒿)	-	-	-	-
<i>Lactuca sativa</i> (結球萵苣)	-	-	-	-
Balsaminaceae (鳳仙花科)				
<i>Impatiens wallerana</i> (非洲鳳仙花)	-	-	-	-
Caricaceae (番木瓜科)				
<i>Carica papaya</i> (木瓜)	-	-	-	-
Chenopodiaceae (藜科)				
<i>Chenopodium amaranticolor</i> (紅藜)	NL	-	+	-
<i>Chenopodium murle</i> (綠藜)	NL	-	+	-
<i>Chenopodium quinoa</i> (奎藜)	NL	-	+	-
Convolvulaceae (旋花科)				
<i>Ipomoea reptans</i> (甕菜)	-	-	-	-
Cruciferae (十字花科)				
<i>Beta vulgaris</i> (甜菜)	-	-	-	-
<i>Brassica campestris</i> (油菜)	-	M	+	+
<i>Brassica chinensis</i> Linn (青江白菜)	-	-	-	-
<i>Brassica chinensis</i> 白菜	-	-	-	-
<i>Brassica juncea</i> 芥菜 (雪裡蕻)	-	M	+	+
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (花椰菜)	-	Y	+	+
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> 甘藍 (夏光)	-	-	-	-
<i>Raphanus sativus</i> (蘿蔔)	-	-	-	-
Cucurbitaceae (葫蘆科)				
<i>Cucumis anguria</i> (小胡瓜)	-	-	-	-
<i>Cucumis etuliferus</i> (刺角瓜)	-	-	-	-
<i>Cucumis melo</i> (哈密瓜)	-	-	-	-
<i>Cucumis melo</i> (甜瓜)	-	-	-	-
<i>Cucumis melo</i> L. (洋香瓜)	-	-	-	-
<i>Cucumis sativus</i> (大胡瓜)	-	-	-	-
<i>Cucurbita pepo</i> L. (夏南瓜)	-	-	-	-
<i>Cucurbita pepo</i> 南瓜 (東昇)	-	-	-	-
<i>Luffa cylindrica</i> (絲瓜)	-	-	-	-
Gesneriaceae (苦苣苔科)				
<i>Sinningia speciosa</i> (大岩桐)	-	-	-	-
Labiaceae (唇形花科)				
<i>Ocimum basilicum</i> L. (羅勒)	-	-	-	-
<i>Salvia splendens</i> (一串紅)	-	-	-	-
<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq (荊芥)	-	-	-	-
Leguminosae (豆科)				
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (矮性菜豆)	-	-	-	-
<i>Vigna unguiculata</i> (豇豆)	-	-	-	-
Nyctaginaceae (紫茉莉科)				
<i>Mirabilis jalapa</i> (煮飯花)	-	-	-	-

Table 1. (Continued)

Test plant	Symptoms ¹		Back inoculation ²	
	Inoculated leaf	Systemic leaf	Inoculated leaf	Systemic leaf
Polygonaceae (蓼科)				
<i>Antigonon leptopus</i> Hook & Am (珊瑚藤)	-	-	-	-
Rubiaceae (茜草科)				
<i>Coffea arabica</i> (咖啡)	-	-	-	-
<i>Gardenia jasminoides</i> (梔子花)	-	-	-	-
<i>Pentas lanceolata</i> Defflers (繁星花)	-	-	-	-
Solanaceae (茄科)				
<i>Capsicum annuum</i> (辣椒)	NL	-	+	-
<i>Capsicum annuum</i> (藍星甜椒)	NL	-	+	-
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>grossum</i> (紅甜椒)	NL	-	+	-
<i>Datura stramonium</i> (曼陀羅)	NL	-	+	-
<i>Lycopersicon esculentum</i> (番茄)	-	M	+	+
<i>Nicotiana benthaminana</i>	NL	-	+	-
<i>Nicotiana debneyii</i>	Y	M	+	+
<i>Nicotiana glutinosa</i>	NL	-	+	-
<i>Nicotiana megalosiphon</i>	NL	Y	+	+
<i>Nicotiana repanda</i>	NL	M	+	+
<i>Nicotiana rustica</i>	NL	M	+	+
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Hicks (喜國土)	NL	M	+	+
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Vam Hicks (萬國土)	NL	M	+	+
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>Havana</i>	NL	M	+	+
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>kentucky</i>	Y	M	+	+
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>samsun</i>	-	M	+	+
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>TT5</i>	NL	-	+	-
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>White Barley</i>	NL	-	+	-
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>Xanthi</i>	CL	M	+	+
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	NL	-	+	-
<i>Petunia hybrida</i> (矮牽牛)	NL	Y	+	+
<i>Physalis angulata</i> L. (苦蕒)	CL	-	+	-
<i>Physalis floridana</i> (酸漿)	-	-	-	-
<i>Solanum mammosum</i> (五指黃水茄)	-	-	-	-
<i>Solanum melongena</i> (茄子)	-	-	-	-
Umbelliferae (繖形花科)				
<i>Daucus carota</i> (胡蘿蔔)	-	-	-	-
Zingiberaceae (薑科)				
<i>Alpinia speciosa</i> (月桃)	-	-	-	-

¹ Symptom expressed on inoculated and systemic leaves of test plants; CL: cholrotic local lesion; D: leaf distortion; M: mosaic; NL: necrotic local lesions; Y: yellowing; -: no reaction.

² Reaction of *Chenopodium quinoa* after inoculation with inoculated and systemic leaves of test plant; +: *C. quinoa* developed local lesions after inoculation; -: *C. quinoa* did not react to the inoculation.

均以不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 乳化。最後一次注射後第 7 天及 14 天分別進行二次頸靜脈部份採血，並製備抗血清，同時以環形界面沈澱法 (Ring interface precipitation test) 測試抗體力價。

病毒鞘蛋白分子量測定

參照 Laemmli⁽¹⁰⁾ 之方法，將純化之病毒及感染供試病毒分離株之奎藜葉片懸浮於 LDS buffer [0.125 M

Tris-HCl, pH 6.8 內含 10 % (w/w) SDS、4 % (v/v) 2-mercaptoethanol 及 10 % (v/v) glycerol]，沸水處理 3 分鐘後，進行 SDS-PAGE 電泳分析。

血清學反應

SDS 免疫擴散反應 (SDS-immunodiffusion test)：參照 Purcifull and Batchelor⁽¹²⁾ 所發表之 SDS 雙向免疫擴散法測試大王仙丹 BNL 分離株與番茄嵌紋病

毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)、胡瓜脈綠斑紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) 及齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) 等三種 tobamoviruses 之血緣關係，上述抗體及對照抗原均為張清安博士所提供。

西方轉漬反應 (Western blotting test)：本試驗參照 Towbin⁽¹³⁾ 等所發表之西方轉漬免疫分析法，分析 BNL 分離株在感病大王仙丹不同組織中之分佈，並同時與三種 *Tobamovirus* 屬病毒包括 CGMMV、ToMV 及 ORSV 比較抗原特异性。

間接式酵素連結免疫吸附反應 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, Indirect ELISA)：本試驗於 2005 年 1 至 6 月每月定期由前述 17 處田間調查樣區採集大王仙丹葉片及幼根樣品，以 BNL 分離株抗體進行 Indirect ELISA 檢測。檢測程序遵照過去所發表之步驟進行⁽²⁾，使用稀釋 6000 倍之酵素結合免疫球蛋白 (enzyme-linked goat anti-rabbit IgG) 作為二次抗體來源。此外並以 ToMV、CGMMV 及 ORSV 之抗體與 BNL 分離株抗原進行血清學關係比對。

鞘蛋白基因之增幅、定序與分析

利用商用植物全量 RNA 萃取試劑組萃取 0.1 g 感病組織中之 RNA (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany)，再以 one step RT-PCR kit (Stratagene Inc, La Jolla, CA, USA) 進行 BNL 分離株鞘蛋白基因之增幅。增幅反應所使用之引子對乃參考 Jan *et al.*⁽⁹⁾ 所發表之 ToMV 鞘蛋白基因專一性引子對 (P10113：5'-GCGAGCCATGGATTCTTACTCAAT TACT-3' 及 P10114：5'-ACTCTCGGATCCTTAAGATGCAGGTGCAGA-3')。RT-PCR 反應條件為先以 37 °C，30 分鐘；93 °C，5 分鐘，進行一個循環；而後以 93 °C，1 分鐘；50 °C，1 分鐘；72 °C，2 分鐘，進行 34 個循環；最後以 72 °C，10 分鐘進行一個循環。增幅結果則以 1.2 % 洋菜膠進行電泳分析。所增幅之 PCR 產物乃選殖於 pOSI-T 載體上，選殖步驟乃遵照廠商建議之程序進行。所篩選之選殖株則送交廠商以 ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀 (Perkin-Elmer, CA, USA) 進行核苷酸序列分析。解序所得資料以 Vector NTI Suite 軟體 (InforMax, Inc. Wisconsin, USA) 進行分析，再與 GenBank 上已知之 tobamoviruses 序列進行比對。

南方轉漬雜合分析及化學冷光偵測

將前述 RT-PCR 產物之電泳膠體利用毛細法 (capillary transfer) 轉漬到尼龍膜 (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) 上。再以 XL-1000 UV-crosslink

(1200 × 100 μj/cm²) 處理，促進 DNA 與尼龍膜之緊密結合；其後以非放射性標定試劑組 (BrightStar™ Psoralen-Biotin, Ambion Inc. Texas, USA) 循廠商建議之程序進行探針之製備及雜合反應，再以 AVIDx-AP 試劑組 (Tropix Inc., MA, USA) 對發生專一性雜合標定之 RT-PCR 產物進行偵測。所得之結果以 CDP-star 試劑組 (Tropix Inc., MA, USA) 進行冷光顯影於 X-ray 底片上。

結果

田間病徵及病毒病害發生調查

自 2002 年 10 月起至 2004 年 10 月止，每 3 個月定期以病徵目視法調查嘉義市、高雄市及屏東縣市等地區之大王仙丹，共計調查 6492 叢。總計此三個地區大王仙丹出現疑似病毒病徵狀之叢率分別為 70 %、85 % 及 80 %。所呈現之疑似病毒感染病徵包括嵌紋、脈綠、皺縮及輪點等 (圖一)。

大王仙丹病毒病徵周年變化調查

自 2002 年 10 月至 2005 年 3 月由 17 處調查地點蒐集呈現嵌紋、脈綠、輪點或皺縮等病徵植株之插穗，於溫室內扦插共獲得 95 株成活植株，觀察其病徵周年變化，發現全年各月均可明顯判別，但以 4 - 8 月高溫季節期間所新生之葉片其病徵較為明顯易見，其他季節所新生之葉片病徵則較為緩和。

病毒之分離

摘取上述呈現明顯病徵之大王仙丹葉片及幼根，以機械摩擦法分別接種於紅藜及奎藜葉片，約 10-14 日後出現局部性壞疽病斑。經 7 次單斑分離獲得一純系病毒分離株，將其定名為 BNL。

寄主範圍測試

將 BNL 分離株分別接種於 19 科 69 種供試植物，計有 7 科 34 種會受到感染，其中 18 種呈系統性感染，16 種為局部感染 (表一)。由接種結果得知葫蘆科瓜類植物不受感染，而茄科植物中多數煙草與番茄均可罹病且呈現系統性感染。此特性與文獻中所記載之番茄嵌紋病毒 (ToMV) 頗為類似，故試驗中比較 BNL 分離株與農試所所保存之 ToMV 番茄分離株 (TARI) 對番茄之病原性，發現 TARI 分離株病原性較強，接種後 5-6 日即可於新葉出現明顯嵌紋病徵；而 BNL 分離株則於接種後 7-8 日才出現較為輕微之嵌紋病徵。

生體外 (in vitro) 物理性質測定

以奎藜為生物檢定寄主分析 BNL 分離株之各項生體外物理性質發現，其熱不活化溫度為 65-70 °C，耐稀釋度為 10^9 - 10^{10} ，其感病汁液於室溫 (24 °C) 及冷凍 (-70 °C) 下經過 14 個月仍能維持感染活性。

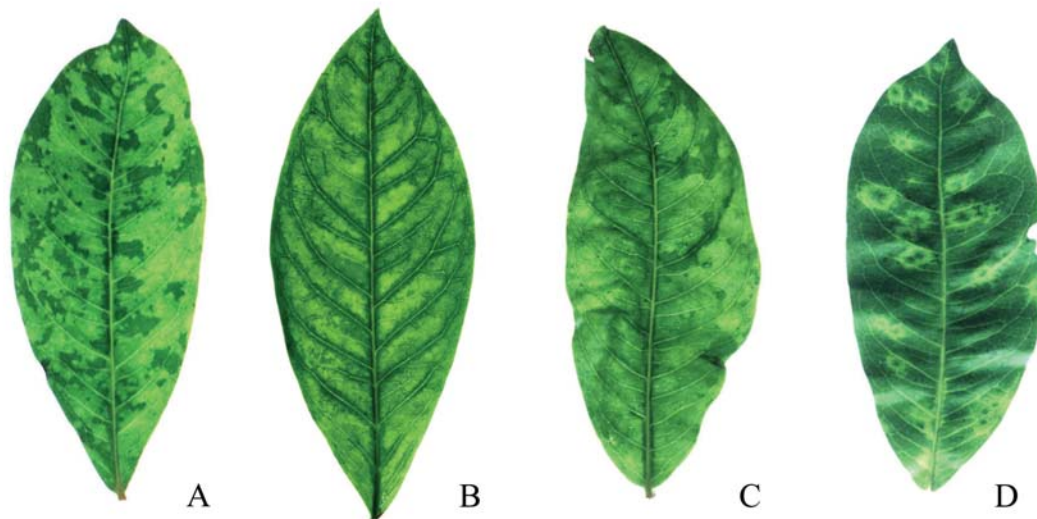
電子顯微鏡觀察

以 2 % 醋酸鉍陰染法觀察 BNL 分離株之大王仙丹病汁液，可觀察到長度為 250-300 nm 之硬桿狀粒子，其形態大小與 tobamoviruses 之典型顆粒近似。另外觀察純化後之 BNL 分離株試料，亦可見相同形態之硬桿狀病毒顆粒 (圖二)，經測量 100 個病毒顆粒之長寬度

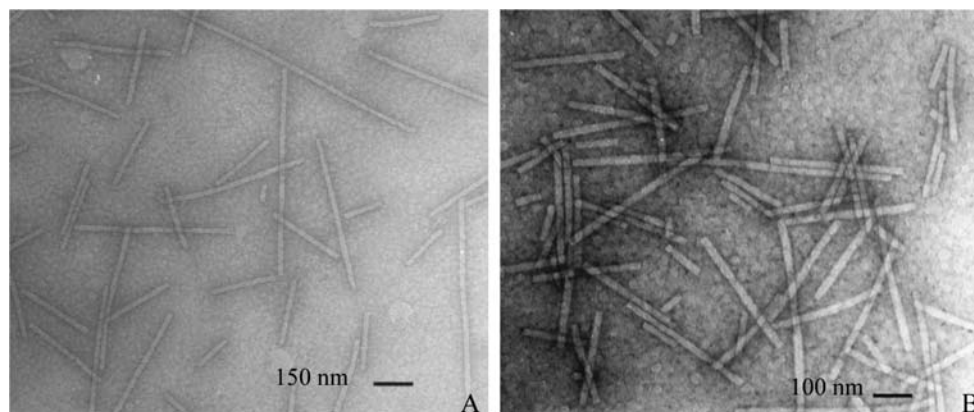
後估計其大小為 275-325 × 18 nm。

病毒純化及抗血清之製備

將 BNL 分離株以前述之步驟純化病毒，其純化試料以分光光譜儀 (Hitachi U-2001 spectrophotometer) 測定其紫外光 220 nm 至 320 nm 間之吸收曲線 (adsorption spectrum)，發現在 260 nm 及 247 nm 處分別出現最高及最低吸收峰。其 A_{260}/A_{280} 比值為 1.19，依 Dijkstra and de Jager⁽⁷⁾ 所發表之方法估算病毒收量，每 100 公克奎藜單斑材料約可純化 74 mg 病毒。將此純化病毒顆粒試料如方法所述免疫注射於紐西蘭白兔，所得抗血清經環形界面法測得之力價為 2048 倍。



圖一、田間大王仙丹葉部所觀察到之四種疑似病毒感染之病徵。A. 嵌紋；B. 脈綠；C. 皺縮；D. 輪點。
Fig. 1. Four different virus like symptoms observed in the fields on *Ixora duffii* cv. 'Super King' leaves. A. mosaic; B. vein banding; C. rugose; and D. ringspot.



圖二、由接種番茄嵌紋病毒 BNL 分離株之奎藜葉片及純化病毒試料於電子顯微鏡下所觀察之病毒顆粒形態。A：奎藜罹病葉直接陰染；B：純化後病毒試料陰染。
Fig. 2. Electron micrograph of negatively stained virus particles observed from A. leaf-dip preparation of *Chenopodium quinoa* inoculated with BNL isolate of *Tomato mosaic virus* (ToMV-BNL) and B. purified virions of ToMV-BNL.

病毒鞘蛋白分子量測定

BNL 分離株之純化試料經 SDS-PAGE 電泳及西方轉漬分析其鞘蛋白後，發現其具有單一種鞘蛋白基本單位 (coat protein subunit)，估計其分子量約為 17.5 kDa (圖三)。

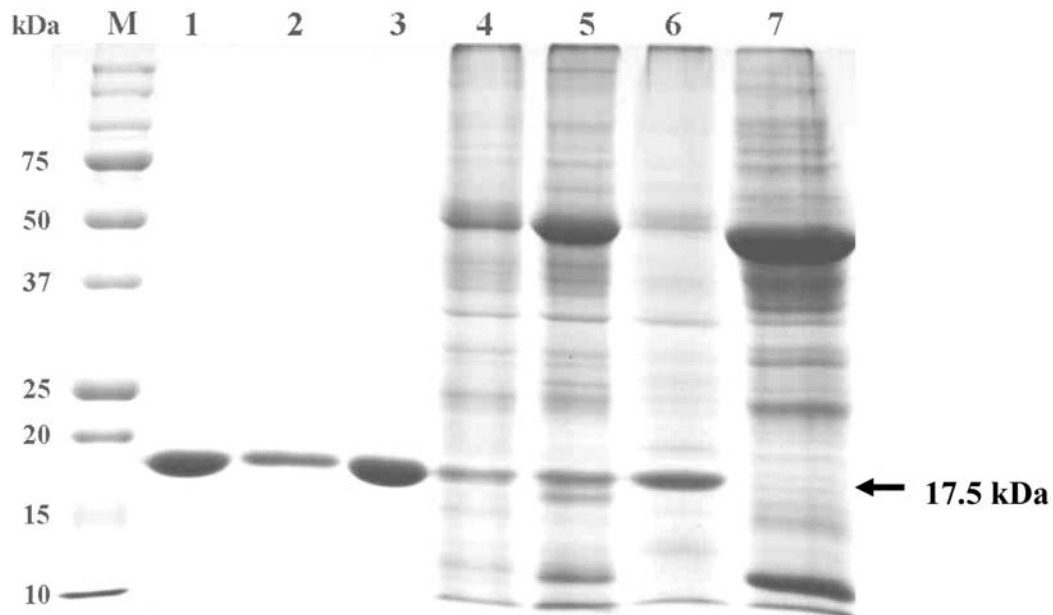
血清學反應

以本研究所製備之 BNL 分離株之抗血清進行 SDS 免疫擴散反應，發現其與同源之感病奎藜葉片汁液、純化之 BNL 病毒試料及感染 ToMV 之奎藜葉片汁液均可產生明顯沈澱反應，但與感染 ORSV 之奎藜葉片汁液僅出現微弱反應，而不與 CGMMV 發生任何反應 (圖四)。此結果顯示本研究分離自大王仙丹之 BNL 分離株與農試所由番茄所分離之 ToMV-TARI 分離株具有極為接近之血清類源關係。此一推論在利用 ToMV-TARI 分離株之抗血清進行反向試驗 (reciprocal test) 後亦獲得證實，該抗血清與 BNL 分離株之純化病毒與奎藜病汁液亦可產生強烈沈澱反應 (圖四)。不過在此試驗中上述抗血清並不與田間呈現嵌紋病徵之大王仙丹之葉片與幼根組織產生沈澱反應，此現象推測可能與

大王仙丹組織內病毒濃度偏低有關。此一推論在後續之西方轉漬法及 Indirect ELISA 試驗中獲得證實，利用 BNL 分離株之抗體可在大王仙丹嵌紋病葉及幼根組織內順利偵測到與正反應對照抗原分子量 (17.5 kDa) 相同之條帶 (圖五)，且該條帶之濃度明顯低於對照感染 BNL 之奎藜單斑組織 (圖五)。而在 Indirect ELISA 反應中 BNL 分離株之抗體雖能與田間大王仙丹之葉部與根部組織抗原反應，但反應值偏低接近背景值 (表二)。證實大王仙丹組織內確實含有 ToMV 抗原但濃度極低。另外由 Indirect ELISA 的結果也證實 BNL 分離株與 ToMV 間抗原性極為接近，而 ToMV 與 ORSV 及 CGMMV 間具有微弱之血清關係。

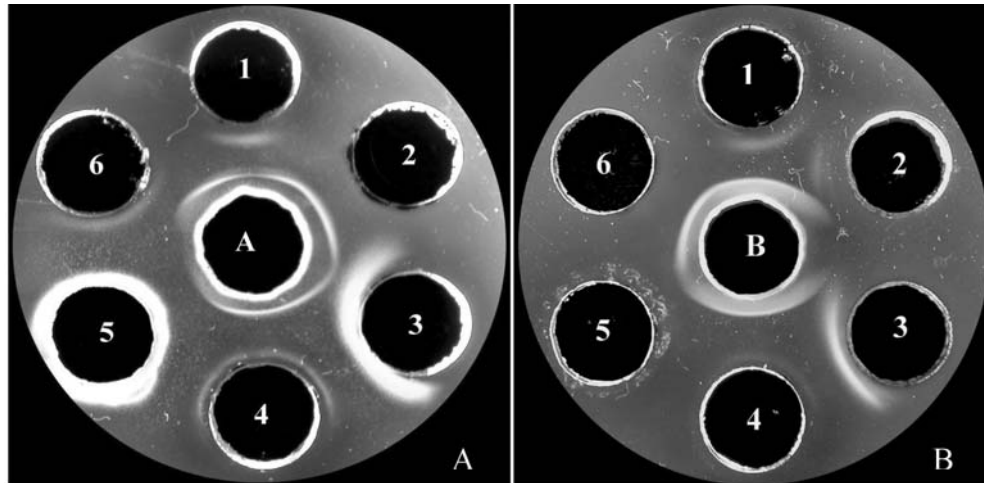
鞘蛋白基因之選殖、定序與分析

利用 Jan *et al.*⁽⁹⁾ 所發表之 ToMV 鞘蛋白基因專一性引子對 (P10113/P10114) 進行 RT-PCR 反應，可順利由感染 ToMV-TARI 分離株之奎藜葉片組織增幅出一段符合預期大小之 0.5 kb 核酸產物 (圖六A)。在相同之反應條件下，同一引子對亦可由接種 ToMV-BNL 分離株之奎藜組織、純化之 ToMV-BNL 病毒試料及採集自不



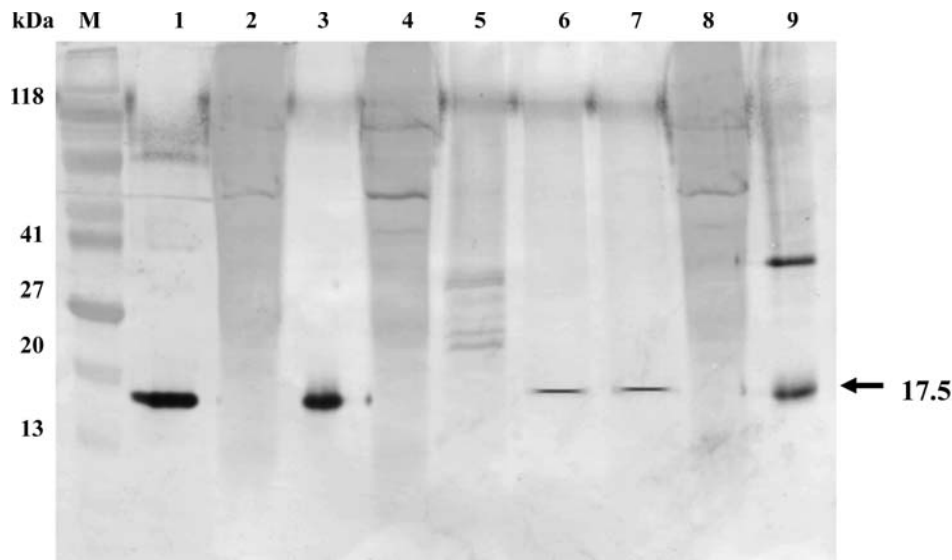
圖三、利用聚丙烯醯胺凝膠電泳法分析番茄嵌紋病毒 BNL 分離株之鞘蛋白分子量。行 M 為標記蛋白；行 1 至 3 分別為由奎藜、紅藜及煙草 (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) 組織上所純化之 BNL 分離株病毒試料；行 4 至 6 為接種 BNL 分離株呈現壞疽斑之奎藜、綠藜及紅藜葉片粗汁液；行 7 為對照健康奎藜葉片。

Fig. 3. Analyses of molecular weight of coat protein subunit of BNL isolate of *Tomato mosaic virus* (ToMV-BNL) isolated from Ixora (Super King) by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Lane M, marker proteins; Lanes 1-3, purified virus samples obtained from *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, and *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, respectively; Lanes 4-6, crude saps extracted from the leaves of *C. quinoa*, *C. murale*, and *C. amaranticolor* inoculated with ToMV-BNL; Lane 7, crude sap extracted from healthy *C. quinoa*.



圖四、利用 SDS- 免疫擴散反應比較感染大王仙丹之番茄嵌紋病毒 BNL 分離株與其他 tobamoviruses 之血清類緣關係。中間孔穴添加感染大王仙丹之番茄嵌紋病毒 BNL 分離株 (ToMV-BNL) 之抗血清 (A) 及 ToMV-TARI 分離株之抗血清 (B)；周圍孔穴添加 (1) 接種 ToMV-TARI 分離株之奎藜葉片抗原；(2) ToMV-BNL 之純化病毒顆粒；(3) 接種 CGMMV 之奎藜葉片抗原；(4) 接種 ToMV-BNL 之奎藜葉片抗原；(5) 接種 ORSV 之奎藜葉片抗原；(6) 健康奎藜葉片抗原。

Fig. 4. SDS-immunodiffusion tests on the serological reactivities of antiserum against BNL isolate of *Tomato mosaic virus* infecting *Ixora* spp. to the antigens of some tobamoviruses. The center wells were charged with crude antisera against ToMV-BNL (A) and ToMV-TARI (B) as a control. The peripheral wells were filled with antigens of (1) *Chenopodium quinoa* leaves inoculated with ToMV-TARI; (2) purified virions of ToMV-BNL; *C. quinoa* leaves inoculated with CGMMV (3), ToMV-BNL (4) and ORSV (5), respectively; (6) healthy leaf of *C. quinoa*.



圖五、利用西方轉漬反應分析番茄嵌紋病毒 BNL 分離株 (ToMV-BNL) 於大王仙丹葉片及根部組織中之分佈。行 M 為標記蛋白；行 1 為 ToMV-BNL 之純化病毒試料；行 2、4 及 8 為健康奎藜葉片；行 3 為接種 ToMV-BNL 之奎藜葉片；行 5 為無病徵之矮仙丹 (*Ixora × williamsii* 'Sunkist') 葉片；行 6 及 7 分別為呈現嵌紋病徵之大王仙丹葉片及幼根組織；行 9 為接種 ToMV-TARI 分離株之奎藜葉片。本試驗所使用之抗血清為稀釋 1000 倍之 ToMV-BNL 抗體。

Fig. 5. Analyses of distribution of BNL isolate of *Tomato mosaic virus* (ToMV-BNL) in the leaf and root tissues of *Ixora* spp. by western blotting test using antiserum against ToMV-BNL. Lane M : protein markers ; Lane 1, purified virus of ToMV-BNL ; Lanes 2、4 and 8, non-inoculated leaf tissue of *Chenopodium quinoa* ; Lane 3, leaf tissue of *C. quinoa* inoculated with ToMV-BNL ; Lane 5, healthy leaf tissue of *Ixora × williamsii* 'Sunkist' ; Lanes 6 and 7, leaf and root tissue, respectively, collected from *Ixora* (Super King) with mosaic symptoms ; Lane 9, leaf tissue of *C. quinoa* inoculated with ToMV-TARI. A 1000x diluted antiserum against ToMV-BNL was used in this test as primary antibody.

討 論

同地區之大王仙丹嵌紋病葉或幼根組織中增幅出相同大小之核酸產物(圖六A)，證實這些田間樣品組織內的確存在 ToMV 病毒。由於部分田間樣品所增幅出之產物訊號明顯低於正反應對照樣品，甚至有部分樣品電泳分析圖中未出現可判別之訊號，但這些樣品若進一步以 ToMV-TARI 鞘蛋白基因之專一性探針進行雜配反應(hybridization)時則均能顯現專一性訊號(圖六B)，顯示田間呈現嵌紋病徵之大王仙丹組織內的確感染 ToMV，而其病毒濃度雖低但確實存在。

將上述由 BNL 分離株所增幅之核酸產物進一步選殖於 pOSI-T 載體上，再將選殖株以核酸自動定序儀解讀其核酸序列，結果由 X-2 選殖株之嵌入序列解讀出 483 bp 之核苷酸序列(圖七)。以 NCBI 之 BLAST program 分析之結果發現，此序列含單一完整之轉譯架構(open reading frame)具有 160 個氨基酸訊息。經與 GenBank 上已知之 tobamoviruses 鞘蛋白基因比對分析結果，此序列與 ToMV 鞘蛋白基因具有 97.7-99.0% 之核苷酸序列相同度(nucleotide sequence identity)；而胺基酸序列相同度(amino acid sequence identity)亦高達 97.5-98.8% (表三)。其中與 ToMV 的代表分離株 ToMV-OM⁽¹⁴⁾ 鞘蛋白基因具有 98.8% 之核苷酸序列相同度及 98.1% 之胺基酸序列相同度；而與農試所分離之 ToMV-TARI 分離株之鞘蛋白基因核苷酸及胺基酸序列相同度更分別高達 99.9% 及 100% (表三)。另外本序列與已登錄之煙草嵌紋病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV) 之鞘蛋白基因序列在核苷酸及胺基酸相同度上均分別僅達 71.7-74.6% 及 77.5-83.1%。顯示 BNL 分離株確實與 TMV 在親源性上較為疏離，而與 ToMV 較為親近。

1994 年本研究室首度於屏東縣內埔鄉發現大王仙丹有疑似病毒感染之病害後，經多次利用機械接種方式試圖將病毒分離接種於其他草本寄主皆未能成功。然電子顯微鏡之觀察結果一再顯示病組織中有短桿狀之病毒顆粒存在，顯見此病毒分離之不易。其原因可能與病毒於葉片組織中之濃度偏低，或大王仙丹體內可能含有酚類(phenols)、單寧(tannins)或氧化酵素(oxidases)等抑制病毒活性之物質^(5, 7, 8)。有鑑於此，2002 年 10 月起吾等調整分離用緩衝液配方，並採取長期固定每月進行機械接種分離之策略，終於在 2004 年 3 月成功將病毒接種於奎藜葉片產生局部病斑，並且發現以大王仙丹之根部為接種源較葉片容易分離到病毒，推測其原因除緩衝液配方可能有利於病毒之穩定外，亦可能是根部所含病毒抑制物質較少所致。

分離所獲之 BNL 單斑分離株經一系列特性探討後，確定具有典型直硬桿狀顆粒，其長寬大小 275-325 × 18 nm 與 *Tobamovirus* 屬病毒特性一致。人工接種試驗證實此分離株能夠系統性感染部分供試的茄科植物如番茄及煙草，從所接種之茄科植物反應上判斷此病毒與番茄嵌紋病毒之特性極為類似。另外其生體外(in vitro)物理性質如耐熱性、耐稀釋性及耐保存性方面亦均與 *Tobamovirus* 屬病毒特性符合。至於血清類源關係之比對結果，不管利用 SDS-immunodiffusion test 或 ELISA 進行比較，均顯示 BNL 分離株與國內已發生之番茄嵌紋病毒(ToMV)最為接近，而與其他已知的 *Tobamovirus* 屬病毒較為疏離。以上證據一再顯示本研究由大王仙丹所分離之 BNL 可能即為番茄嵌紋病毒之

表二、利用 Indirect ELISA 比較感染大王仙丹之蕃茄嵌紋病毒BNL分離株與其他二種台灣已知之 tobamoviruses 之血清親源關係

Table 2. Comparison of serological relatedness between three tobamoviruses reported in Taiwan with BNL isolate of *Tomato mosaic virus* infecting *Ixora* spp in indirect ELISA tests

Antigen ¹	Antisera ²			
	ToMV-BNL	ToMV-TARI	CGMMV	ORSV
Symptomatic <i>Ixora</i> leaf	0.40 ³	0.28	0.09	0.10
Symptomatic <i>Ixora</i> root	0.23	0.04	0.02	0.00
Purified virions of ToMV-BNL	3.18	2.19	0.19	0.28
ToMV-BNL infected <i>C. quinoa</i>	3.91	2.00	0.27	0.27
ToMV-TARI infected <i>C. quinoa</i>	0.43	2.08	0.22	0.30
CGMMV infected <i>C. quinoa</i>	0.08	0.10	0.72	0.02
ORSV infected <i>C. quinoa</i>	0.20	0.20	0.09	3.41
Healthy leaves of <i>C. quinoa</i> (CK)	0.07	0.10	0.07	0.03

¹ One gram of fresh tissue of infected plant was ground in 30 ml of coating buffer for the reaction with different antisera as listed on the table.

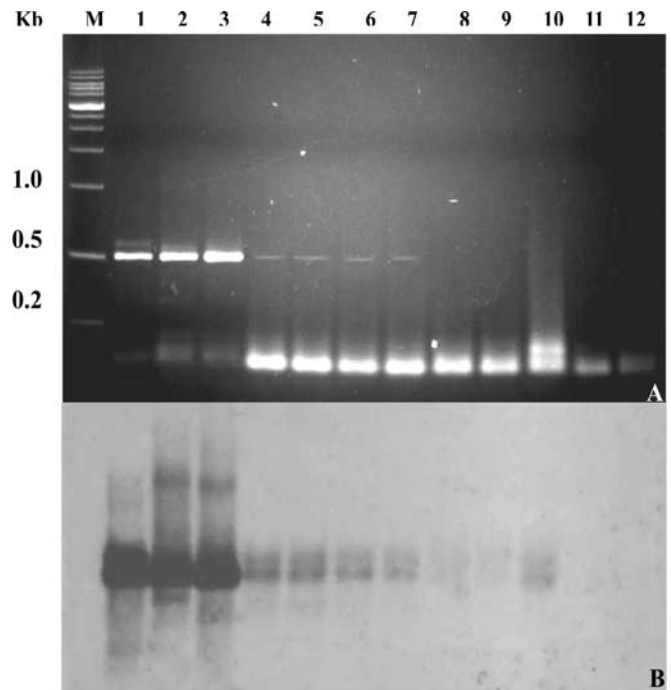
² A 1/1000 of dilution of immunoglobulin G (1 mg/ml of stock solution) of each antisera were used as primary antibodies in the ELISA.

³ Averages of EIA absorbance readings at 405 nm of two replicate experiments.

一個分離株。此項推論在吾等利用 ToMV 之專一性引子對針對大王仙丹病組織或分離之純系 BNL 分離株所進行之 RT-PCR 試驗，確定能獲得預期大小且序列相符之核酸片段後，獲得進一步的證實。在後續的實驗中，本研究進一步針對 BNL 分離株之鞘蛋白基因進行解序分析，最後也證實此分離株確實與 ToMV 具有 97% 以上之序列相同度。

本試驗之各項結果已明確顯示大王仙丹為 ToMV 之系統性寄主，根據西方轉漬、RT-PCR 及南方雜合反應之結果，ToMV 在大王仙丹之葉片及根部組織中之濃度雖然偏低，但病毒確實存在其組織內應屬無庸置疑之事實。不過此項結果亦凸顯大王仙丹雖為 ToMV 之系統性寄主，但並未能如同其他茄科寄主一般可以提供 ToMV 良好的增殖環境，可能僅為病毒在自然界中遭遇理想之繁殖寄主前暫時之棲身處。此等關係也可能是自然界中寄生物 (parasite) 與其寄主 (host) 共演化 (coevolution) 的一個常見過程 (common process)。吾等推論，病毒在演化的過程中基於存活的需要，會逐漸與所接觸的植物演化出共存的寄主關係，二者間由於基因之接觸 (contact) 與互動 (interaction)，可由不親合 (incompatible) 逐漸演變為部分親合 (partial compatible)，甚至最終成為完全親合 (highly compatible) 的寄生關係。以目前 ToMV 與大王仙丹的關係看來，很可能處於 partial compatible 的階段，病毒雖未能於組織內大量繁殖，但已能順利存活並少量增殖，未來經由二者間基因之進一步互動，可能演化出可以在大王仙丹大量增殖的病毒分離株或篩選出可以被 ToMV 大量繁殖的突變植株。

根據本研究之調查，呈現嵌紋病徵之大王仙丹其病徵明顯程度與溫度有密切關係，高溫季節病徵較為明顯，此期間更由於雨水較充足，大王仙丹枝條與葉片之生長較為旺盛，因此在新生葉片上也比較容易呈現嵌紋病徵。由於大王仙丹屬於無性繁殖之植物，因此吾等無法順利找到確定無病毒之仙丹植株供接種試驗，以致本研究目前僅能證明呈現嵌紋病徵之大王仙丹中確實有 ToMV 存在，而尚無法證明該嵌紋病徵乃 ToMV 所造成之專一性病徵，此部分仍有待後續之實驗方能釐清。然而，綜觀過去有關 ToMV 寄主範圍之文獻，仍未有任何 ToMV 感染大王仙丹之紀錄，本研究首度證實大王仙丹可能成為傳播或潛藏 ToMV 之一種新紀錄寄主，此訊息值得番茄生產者之注意，應避免此一寄主進入生產環境中，以免遭受 ToMV 病毒感染之危害。



圖六、利用反轉錄聚合酶增幅連鎖反應 (RT-PCR) (A) 及南方雜配反應 (B) 分析大王仙丹感染番茄嵌紋病毒 (ToMV) 之情形。進行 RT-PCR 時乃利用 Jan *et al.* (2003) 所發表針對 ToMV 鞘蛋白基因 (CP gene) 設計之專一性引子對 (P10113/P10114)⁽¹²⁾。進行南方雜配反應時乃因循材料與方法中所述流程製備對應 ToMV-TARI 分離株之 CP gene 專一性核酸探針。行 M：標準 DNA 梯度標誌；行 1：接種 ToMV-TARI 分離株之奎藜葉片組織；行 2：純化之 ToMV-BNL 病毒顆粒試料；行 3：接種 ToMV-BNL 之奎藜葉片組織；行 4：採自屏東之大王仙丹嵌紋葉片組織；行 5：採自屏東之大王仙丹嵌紋病株幼根組織；行 6-11：採自不同地區之大王仙丹葉片組織；行 12：健康對照奎藜葉片組織。

Fig. 6. Detection of *Tomato mosaic virus* (ToMV) in *Ixora* spp. by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (A) followed by Southern hybridization test (B). RT-PCR was done using a primer pair (P10113/P10114) specific to ToMV coat protein (CP) gene (Jan *et al.*, 2003) and Southern hybridization was performed with a biotin-labeled DNA probe specific to ToMV CP which was synthesized by the procedures described in the text. Lane M: Kb DNA ladder markers; Lane 1: *Chenopodium quinoa* leaves inoculated with ToMV-TARI; Lane 2: purified virions of ToMV-BNL; Lane 3: *C. quinoa* leaves inoculated with ToMV-BNL; Lane 4: leaf tissue of *Ixora* spp. with mosaic symptom collected from Pingtung; Lane 5: root tissue of *Ixora* spp. with mosaic symptom collected from Pingtung; Lanes 6-11: leaf tissues of *Ixora* spp. collected from various locations; Lane 12: healthy leaf tissue of *C. quinoa* as control.

```

      M D S Y S I T S P S Q F V F L S S V W A
1  ATGGATTCTT ACTCAATTAC TTCTCCATCG CAATTTGTGT TTTTGTGCATC TGTATGGGCT
      D P I E L L N V C T N S L G N Q F Q T Q
61 GACCCTATAG AATTGTTAAA CGTTTGTACG AATTCGTTAG GTAACCAGTT TCAAACACAG
      Q A R T T V Q Q Q F S E V W K P F P Q S
121 CAAGCAAGAA CTA CTGTTCA ACAGCAGTTC AGCGAGGTGT GGAAACCTTT CCCTCAGAGC
      T V R F P G D V Y K V Y R Y N A V L D P
181 ACCGTCAGAT TTCCTGGCGA TGTTTATAAG GTGTACAGGT ACAATGCAGT TTTAGATCCT
      L I T A L L G A F D T R N R I I E V E N
241 CTAATTACTG CGTTGCTGGG GGCTTTTCGAT ACTAGGAATA GAATAATCGA AGTAGAAAAC
      Q Q S P T T A E T L D A T R R V D D A T
301 CAGCAGAGTC CGACAACAGC TGAAACGTTA GATGCTACCC GCAGGGTAGA CGACGCTACG
      V A I R S A I N N L V N E L V R G T G L
361 GTTGCAATTC GGTCTGCTAT AAATAATTTA GTTAATGAAC TAGTAAGAGG TACTGGACTG
      Y N Q N T F E S M S G L V W T S A P A S
421 TACAATCAGA ATACTTTTGA AAGTATGTCT GGGTTGGTCT GGACCTCTGC ACCTGCATCT
      *
481 TAA
    
```

圖七、番茄嵌紋病毒 BNL 分離株之鞘蛋白基因核苷酸序列及其演譯之胺基酸序列。* 為胺基酸序列終止碼。
 Fig. 7. Nucleotide and deduced amino acid sequences of BNL isolate of *Tomato mosaic virus*. *represents stop codon of the reading frame.

表三、感染大王仙丹之番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV) BNL 分離株之鞘蛋白基因與已部份發表之 ToMV 及煙草嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*, TMV) 序列之比較

Table 3. Coat protein gene sequence identities of BNL isolate of *Tomato mosaic virus* (ToMV) obtained from Ixora (Super King) to some other ToMV and *Tobacco mosaic virus* (TMV) isolates available in the GenBank

Virus isolate	Assession No.	Source	Identities (%)	
			nucleotide	amino acid
ToMV (TARI)		Taiwan	99.9	100
ToMV Queensland	AF332868	Australia	99.0	98.8
ToMV OM	X02144		98.8	98.1
ToMV L11A-Fukushima	AB083196	Japan	98.8	98.8
ToMV	AJ011934	China	98.8	98.1
ToMV Lisianthus	AY383730	Taiwan	98.8	98.8
ToMV	AJ429083	Germany	97.7	98.1
ToMV Camellia	AJ417701	China	97.7	97.5
TMV	AF516913	China	74.6	81.9
TMV Fujian	AF395127	China	74.2	83.1
TMV	AF27321	USA	74.0	82.5
TMV	AF165190	China	74.0	82.5
TMV Potato 4	AF318218	South Korea	73.3	81.3
TMV Potato 3-4	AF318217	South Korea	72.7	82.5
TMV Tomato	AF126505	India	71.7	77.5

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Chagas, C. M., July, J. R., and Alba, A. P. C. 1981. Mechanical transmission and structural features of Coffee ringspot virus (CRV). *Phytopath. Z.* 102:100-106.
2. Clark, M. G., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. of Gene. Virol.* 34:475-483.
3. Chen, L. Y. 2003. Floral Development and Florweing Regulation of *Ixora*. Dissertation. Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Taichung. 143pp. (in Chinese)
4. Dijkstra, J., and de Jager, C. P. 1998. *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises*. Springer, New York, 459 pp.
5. Fulton, W. R. 1966. Mechanical transmission of viruses of woody plants. *Annu. Rev. Phytopath.* 4:79-102.
6. Gooding, G. V., and Hebert, T. T. 1967. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathology* 57:1285.
7. Gopal, N. H., and Ramaiah, P. K. 1969. Polyphenolic compounds in the leaves of coffee plants. 1. Acid penols. *Turrialba (Costa Rica)*. 19:126-128.
8. Goulart, P. de F. P., Alves, J. D., Magalhaes, M. M., Lima, L. C. de O., and Meyer, L. E. 2003. Purification of polyphenoloxidase from coffee fruits. *Food Chemistry* 83:7-11.
9. Jan, F. J., Zheng, Y. X., Chao, C. H., Ko, W. F., Chang, C. C., and Chen, C. C. 2003. Identification of a tobamovirus causing yellow mottle and stunting symptoms on *lisianthus* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 12:122-132. (in Chinese with English abstract)
10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
11. Ohno, T., Aoyagi, M., Yamanashi. Y., Saito, H., Ikawa, S., Meshi, T., and Okada, Y. 1984. Nucleotide sequence of the Tobacco mosaic virus (Tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. *J. Biochem.* 96:1915-1923.
12. Purcifull, D. E., and Batchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. *Insti. Food Agri. Sci. Florida, Gainesville*. 39pp.
13. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5307-5311.
14. Waterworth, H. E., and Povish, W. R. 1975. A virus related to Cucumber mosaic virus isolated from imported *Ixora* plants. *Phytopathology* 65:728-729.

ABSTRACT

Tsai, J. C.¹, Chen, T. H.^{2,3}, and Chang, C. A.^{1,3} 2008. Identification and characterization of a *Tomato mosaic virus* isolate infecting *Ixora* (*Ixora duffii* cv. 'Super King'). *Plant Pathol. Bull.* 17: 143-155 (1¹ Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.; 2² Department of Plant Protection, National Pingtung University of Science and Technology, Taiwan, R.O.C.; 3³ Corresponding author, E-mail: cachang@cyut.edu.tw; Fax: +886-4-2330-4921 ; E-mail : thchen@mail.npust.edu.tw; Fax: +886-8-774-0293)

Ixora (*Ixora duffii* cv. 'Super King'), originated from west pacific Caroline Islands, is now widely cultivated as ornamental shrubs in Taiwan. A virus-like disease exhibiting mosaic symptom on the leaves of *Ixora* plants was first observed in 1994 at Nei Pu, Pingtung County, but its etiology remained unclear until 2004 that we successfully transferred the mosaic *Ixora* tissue to *Chenopodium quinoa* by mechanical inoculation. After seven successive single lesion transfers, a virus isolate designated as BNL was obtained. Rigid rod shaped virus particles approximately 300 nm in length were observed in BNL-infected tissue under electron microscopy. Physical properties of BNL were characterized as thermal inactivation point, 65-70 °C; dilution end point, 10⁻⁹-10⁻¹⁰; and longevity in vitro at both 24 and -70 °C, more than 14 months. Host range tests of BNL isolate revealed that it could infect at least 34 species among 7 plant families by mechanical inoculation. Most tobacco species and tomato were infected inducing systemic mosaic symptoms by this isolate . Virus particles of BNL isolate was successfully purified from infected *C. quinoa* leaves and used for antiserum production. Analysis of the purified virion in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that it contained a protein subunit with a relative molecular mass of 17.5 kDa. Antiserum produced against BNL reacted strongly with its homologous antigen and to *Tomato mosaic virus* (ToMV), but weakly with two other tobamoviruses, *i.e.* *Odontoglossum ringspot virus* and *Cucumber green mottle mosaic virus* in indirect ELISA and SDS-immunodiffusion test. By the use of a ToMV-specific primer pair reported by Jan *et al.*, an expected 483 bp of DNA fragment was consistently amplified from BNL-inoculated *C. quinoa* and purified virions in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequence analyses confirmed that the amplicon shared 97.7-99.0 % and 97.5-98.8 % identity to those of published ToMV CP gene in nucleotide and amino acid sequences, respectively, indicating BNL isolate is a strain of ToMV. In the experiments of RT-PCR, Southern and Western blotting tests, BNL was found residing in the leaf and root tissues of *Ixora* but with relatively low concentrations, confirming that *Ixora* is a natural host for ToMV. To our knowledge, this represents the first record for the natural infection of ToMV in *Ixora* spp.

Keywords: *Ixora*, Virus identification, *Tomato mosaic virus*