

感染地黃 (*Rehmannia glutinosa*) 的菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*) 之鑑定

廖吉彥¹ 胡仲祺² 高瑞隆³ 鄧汀欽^{1,4}

¹ 台中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所 植病組

² 國立中興大學生物科技所

³ 中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所 農藝組

⁴ 聯絡作者，電子郵件：tcde@wufeng.tari.gov；傳真：+886-4-23338162

接受日期：中華民國 96 年 5 月 25 日

摘要

廖吉彥、胡仲祺、高瑞隆、鄧汀欽. 2007. 感染地黃 (*Rehmannia glutinosa*) 的菸草嵌紋病毒之鑑定. 植病會刊 16: 61-69

從埔里地黃 (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 栽種區及本所中藥材栽培區採集各種疑似病毒感染植株，汁液接種經單斑分離得到一純系病毒株 (RG-1)。從寄主範圍試驗、電子顯微鏡觀察、凝膠雙擴散反應、電泳分析、西方轉漬反應及核酸與胺基酸序列比較，證實所分離的病毒株 RG-1 係屬於菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 的一個獨立系統 (strain)。本病毒接種奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 後會產生局部壞疽病斑。經陰染法電子顯微鏡觀察病毒顆粒為長桿狀，大小約 300-310×16-18 nm。病毒經接種至奎藜繁殖，再利用硫酸銨等密度平衡離心法純化，純化所得試料為抗原用以注射白兔製備抗血清。電泳分析純化的病毒鞘蛋白，其主要蛋白質分子量約為 19 kDa。經西方轉漬反應、SDS- 瓊脂免疫擴散反應 (immunodiffusion)，自製的抗體與 RG-1 有同源 (homologous) 血清反應。從本病毒 RNA 3' 端解序 480 個核苷酸，與 GenBank 中的 TMV (Access No. AY555269) 比較鞘蛋白基因之核苷酸，其相同度達 97.1%，而其胺基酸相似度則為 99.4%。本報告為台灣地區 TMV 感染地黃植株的首篇紀錄。

關鍵詞：地黃、菸草嵌紋病毒、病徵、抗血清、比對

緒言

地黃 (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 屬於玄參科植物，為中醫常用藥材，其藥性屬味甘、苦，性寒，具清熱升津、涼血、止血之功能。傳統上用於熱風傷陰、舌絳煩渴、發斑發疹、吐血、衄血、咽喉腫痛等症⁽¹⁷⁾。地黃為多年生草本植物，塊根肉質肥厚，橘黃色圓柱形或紡錘形，直徑 2.5 ~ 5.5 公分。新鮮的地黃塊根稱為鮮地黃，生乾者稱為生地黃，蒸乾者稱熟地黃。植株喜陽光充足，晝夜溫差大的環境。塊根在 20 ~ 25 °C 開始膨大增長，25 ~ 28 °C 增長迅速，高溫高濕容易造成爛根。經濟栽培一般不採用種子繁殖，但種子繁殖可應用於雜交育種，種子壽命 1 ~ 2 年，發芽適溫為 20 ~ 30 °C⁽¹⁵⁾。地黃生產主要分布於中國河南、山

西、山東、陝西、河北等地。一般農作栽培主要是利用塊根來繁殖，將秋季收穫的地黃，篩選優良品系和無病蟲害的塊根，埋在地裏或沙土中越冬，待翌年春挖出作種栽。其出苗率一般可達 90 ~ 100 %，產量高且不容易退化⁽⁷⁾。台灣的地黃種源主要是早期由中國大陸引進來台，多年來相同來源的塊根不斷地以無性繁殖方式繁衍，進而散落各地繼代栽種。雖然種植面積不大，近年來在栽培園區，也經常發現地黃植株出現葉部濃綠不均、嵌紋及皺縮等病徵，直接影響植株生長與產量。且病株的地下塊根生育不良，甚至畸形，減低商品價值。

目前文獻未記載關於本土型地黃的病蟲害，而大陸方面則有下列各種病害的紀錄：斑枯病、輪斑病、

根腐病¹⁵⁾、病毒病^{16,18)}及胞囊線蟲病¹⁵⁾等。因此，實有需要對本土型地黃的病蟲害加以探討瞭解。本研究乃利用病毒學診斷鑑定方法，進行病原之分離、純化、與選殖定序，以深入探究本土型地黃病害之病原與其可能來源。

材料與方法

病毒之來源與寄主範圍測定

從埔里地黃栽種區及本所中藥材栽培區採集疑似感染病毒的植株，取其中葉部呈現嵌紋病徵之地黃罹病株(圖一)，以10倍量的0.05M的磷酸緩衝液(PH 7.2)萃取葉部汁液，以磨擦法接種於撒有400目金剛砂之奎藜(*Chenopodium quinoa*)葉片，待7-10天接種葉出現局部病斑後，挑取單一病斑接種於奎藜，如此重複三次後得一純系病毒株(RG1)，再回接於地黃實生苗，並接種於奎藜上繁殖保存，作為後續試驗之接種源。寄主範圍測定接種於地黃、千日紅(*Gomphrena globosa*)、紅藜(*C. amaranticolor*)、綠藜(*C. murale*)、菸草萬國土品種(*Nicotiana tabacum* cv. Vam-Hicks)、豌豆(*Pisum sativum*)、四季豆(*Phaseolus vulgaris*)、蠶豆(*Vicia faba*)、胡瓜(*Cucumis sativus*)及花生(*Arachis hypogaea*)等植物葉片上，於網室中觀察一個月。



圖一、地黃感染病毒所呈現之病徵(如箭頭)。
Fig. 1. Symptoms of *Rehmannia glutinosa* plant infected by virus (as indicated by the arrow).

病毒純化與抗體製備

接種九天後收集奎藜具局部病斑之葉片220g，置-20℃冷凍隔夜，以1倍量的0.5M磷酸緩衝液(pH 8.5, 內含0.01M Na₂-EDTA)淬取汁液。再於4℃下加

入萃取汁液量6% (v/v) 的氯仿(chloroform)攪拌15分鐘後，經8000 rpm (Hitachi CR20B2) 離心10分鐘，取上澄液，以5ml 20% 蔗糖當墊底(cushion)的方式，經28000 rpm (Hitachi SCP70G) 離心2.5小時沉降濃縮病毒，再以0.05 M 硼酸緩衝液(borate buffer、pH 8.2, 內含0.01 M Na₂-EDTA)懸浮沉澱物成為初步純化試料。進一步純化則利用等密度平衡離心法⁽¹¹⁾，將試料在30% Cs₂SO₄中經38000 rpm (Hitachi RP65T) 離心23小時後，離液面2.3 cm處形成一蛋白光帶。抽取純化的病毒帶，以0.01 M 磷酸緩衝液(pH 7.0)充分透析並離心去除雜質後，成為純化病毒試料。經紫外光吸收光譜分析決定病毒純度及濃度後，將E260吸收值除以TMV的E_(0.1%, 1 cm, 260 nm)⁽⁶⁾值即可得到病毒濃度(mg/ml)，進而分裝成定量(1 mg/ml)並加以冷凍保存供後續試驗材料。在進行病毒抗體之製備過程中，乃將此純化病毒試料1 mg/ml加等量之完全補助劑充分乳化，於家兔後腿行肌肉注射，以後每隔七天並以不完全補助劑乳化等量純化病毒試料追加注射，總共追加注射三次。最後一次注射後第七天起每星期自家兔耳部行靜脈部份採血並採集抗血清，所得之抗血清，分裝後置於-75℃下冷凍保存。免疫球蛋白IgG之純化則根據Clark and Adams^(5,6)所述之方法為之。

電子顯微鏡觀察

陰染法：以陰染法進行病毒顆粒之電子顯微鏡觀察^(4,10)，切取接種後具局部病斑之奎藜葉片，壓取粗汁液以等量2% 磷鎢酸(phosphotungstic acid; PTA)行直接陰染後，以Hitach 7000電子顯微鏡進行觀察。進行免疫電子顯微鏡觀察時，則仿照Milne⁽¹⁴⁾所述之程序，先以免疫球蛋白IgG覆膜處理(coating)於銅網(grid)上，與罹病粗汁液在銅網上反應吸附病毒，再以免疫球蛋白IgG覆蓋處理後，以前述方法陰染後再行鏡檢。

病毒鞘蛋白分子量與西方轉漬分析

取經由奎藜的病毒保存葉片純化後之病毒濃度為1 mg/ml 試液10 μl經加熱後，經SDS-PAGE電泳分離後，以0.025% Coomassie blue R250 (CBR250)染色後觀察所出現蛋白帶數目及其移動距離，據以計算病毒鞘蛋白之分子量之大小。另於轉漬槽內，以100 V 通電1.5小時將蛋白轉漬於硝化纖維膜上⁽⁹⁾，再與供試病毒抗體反應，然後以鹼性磷酸酶標定之山羊抗兔免疫球蛋白(Sigma A8233)反應，最後以nitroblue tetrazolium (NBT)及bromochloroindoyl phosphate (BCIP)基質進行呈色⁽⁹⁾。

凝膠雙擴散反應法 (Ouchterony method) 測定病毒反應

利用雙擴散反應法^(1,2)，離中央孔穴相距 4 mm 之周圍同樣作六個等距離之孔穴後，由 RG1 病株之分離株所製成之抗血清放置於中央穴，周圍孔穴分別置放 RG1 病毒分離株、來自煙草的菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (農試所保存)、及胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (農試所保存) 等抗原試料粗汁液以及地黃健康株之粗汁液為對照組，然後水平置於保濕袋中進行擴散反應，觀察有否反應帶的出現。

核酸分析

(一) 反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

取 140 mg 之 RG1 分離株病葉利用全量 RNA 純化試劑組 (Viogene plant total RNA extraction miniprep system)，進行全量 RNA 之抽取純化。以 Reh-F 及 Reh-R 專一性引子對 (Reh-F: 5' - gtggagggaacactatgc -3'; Reh-R: 5' - aattacaacgtgagagacgg -3') 為引子^(8,12)。利用反轉錄試劑組 (Pro Tech., Hot Start RT-PCR kit，內含 AMV reverse transcriptase: 25U、Tag DNA Polymerase: 2U、RNasin: 5U、dNTPs: 1mM) 進行 RT-PCR 試驗反應時，於每一 20 μ l 反應中加入 1 μ l RNA template、17 μ l sterile H₂O、1 μ l 20 Mm Reh-F 及 1 μ l 20 Mm Reh-R，於熱循環反應儀 (Biometra Uno-thermoblock, Biometra biomedizinische Analytik GmbH) 中進行 35 個 PCR 循環反應。反應程序為首先在 58°C RNA 變性 5 分鐘，42°C 下 1 分鐘合成 cDNA，然後進行 35 次 PCR 循環，條件為 94°C 下變性 1 分鐘，56°C 下煉合 1 分鐘，72°C 下聚合 1.2 分鐘⁽¹³⁾，最後一個循環中 72°C 下聚合延長 8 分鐘，反應結果以電泳進行分

析。

(二) 核酸片段選殖和序列分析

經上述 RT-PCR 增幅所得大小約 1.0 kbp 之 DNA 片段，以 TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) 為轉形試劑，經由轉形作用送入 *Escherichia coli* DH5 α 宿主，利用藍白菌落反應初步選出可能含有嵌入序列之菌株，後經微量質體純化分析，進一步選出確定之轉型菌株。再以 ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀 (Perkin-Elmer Applied Cycle Biosystems, CA, USA) 及其配用之螢光標識反應試劑組 (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) 進行核苷酸序列分析，將此所得序列利用 GCG Wisconsin Package 及 DNA STAR 軟體與 GenBank 上已正式登錄之核苷酸序列進行分析比對，進一步分析與不同寄主上已知的 TMV 株系之間的親源關係遠近。

結果

病毒之來源與寄主範圍測定

總共將 RG1 分離株接種於 5 科 10 種不同供試植物，其中共有 3 科 4 種出現病徵，除在回接健康之地黃上有系統性嵌紋病徵 (圖二、A) 外，其餘皆僅產生局部壞疽病斑 (necrotic spots)。即萬國土菸草 (圖二、B)、奎藜 (圖二、C) 及紅藜接種葉於第 8 天後出現約 0.3 mm 大小之黃暈斑點。其餘千日紅、豌豆、蠶豆、胡瓜及花生等則未出現任何病徵。

病毒純化與抗體製備

RG1 分離株的純化所得病毒，其 A260/A280 比值



圖二、地黃病毒分離株 RG1 接種至指示植物所形成之病徵：系統性嵌紋病徵於地黃葉片上 (A)，煙草 (B) 及奎藜 (C) 葉片上局部病斑。

Fig. 2. Symptoms of indicator plants inoculated with *Rehmannia virus* isolate of RG1 : systemic mosaic on *Rehmannia glutinosa* (A) ; local lesions on *Nicotiana tabacum* cv. Vam-Hicks (B) and *Chenopodium quinoa* (C).

為 1.013，依 Dijkstra and De Jager⁶⁾ 估算病毒收量為每 100 克奎藜葉組織約可純化 1.12 mg 病毒；回接原寄主地黃及判別植物，結果發現與上述寄主反應相似。經如法所述共四次的家兔免疫注射後，所採集共 20 ml 之抗血清，分裝後置於 -75 °C 下冷凍保存。

電子顯微鏡觀察

從所接種奎藜所得病斑組織汁液經 2% PTA 直接陰染，所觀察到組織內的病毒顆粒大小約 300-310 × 16-18 nm 桿狀顆粒 (圖三)。純化病毒汁液內顆粒經以上述抗體反應後，在電子顯微鏡下觀察，發現病毒顆粒周圍有抗體吸附修飾 (decoration) 一層暈狀的現象 (未登出)。

鞘蛋白分子量與西方轉漬反應

取經由奎藜的病毒保存葉片純化後之病毒試液經加熱後以含有 1% SDS 的 12% polyacrylamide 膠體電泳分析，並與標記蛋白比對所得結果，其主要結構蛋白分子量約為 19 kDa (圖四A)，且在轉漬於硝化纖維膜後，再與同源抗體反應，在 19 kDa 處產生正反應之反應帶 (圖四B)，與菸草嵌紋病毒之外鞘蛋白分子量相似。

雙向免疫擴散反應

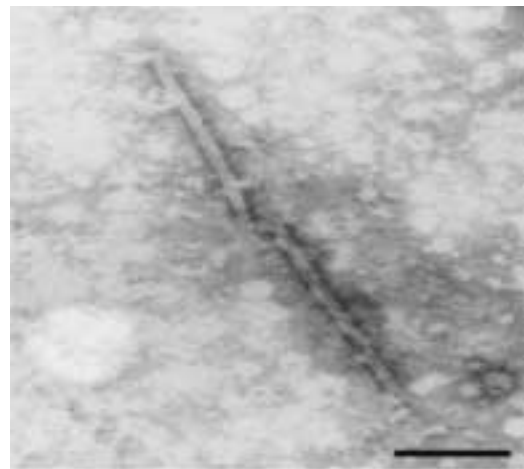
雙向免疫擴散反應試驗顯示 RG1 抗血清只與 RG1

病毒分離株之抗原產生明顯沈澱帶，與來自煙草的 TMV 產生微弱沈澱反應，但不與胡瓜嵌紋病毒 (CMV) 及健康地黃植株產生沈澱反應，顯示地黃病毒 (RG1) 病毒分離株與 TMV 在血清學特性上血緣相近 (圖五)。

核酸分析

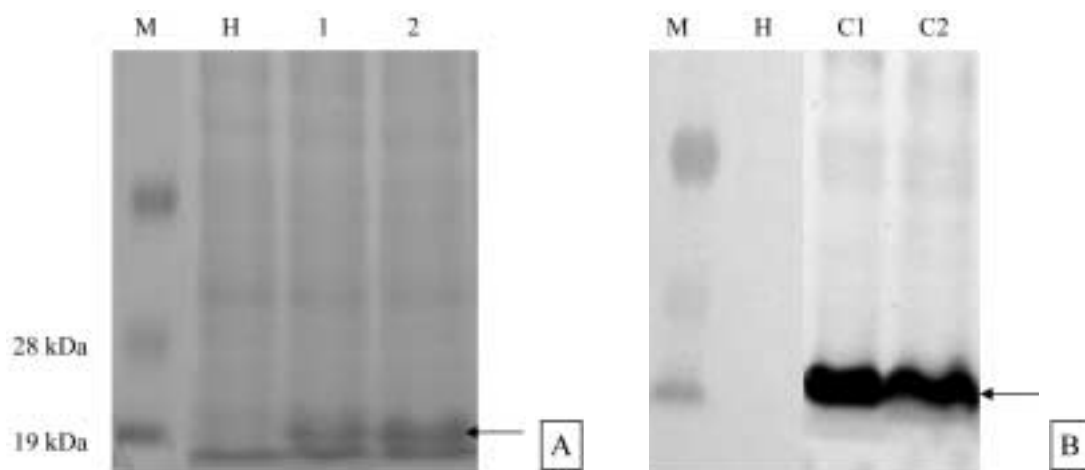
(一) 反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

以 Reh-F 及 Reh-R 為專一引子對，預估可於 RT-



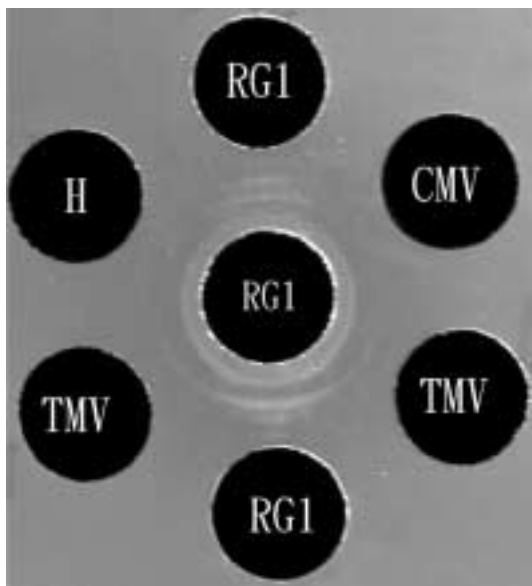
圖三、地黃病毒分離株 RG1 病毒在直接陰染法下以電子顯微鏡觀察之顆粒形態。

Fig. 3. Virions of *Rehmmania* virus isolate RG1 observed by electron microscope. (Direct negative staining, scale bar, 200 nm)



圖四、應用 (A) SDS-PAGE 及 (B) 西方轉漬法分析地黃病毒分離株 RG1 病毒鞘蛋白分子量與血清學性質。M：分子量標示蛋白；H：健康地黃；1 及 2：地黃病毒分離株 RG1 病毒試液；C1 及 C2：二個病毒部分純化試料。箭頭所指即病毒鞘蛋白基本單位所在位置。B 表西方轉漬法以同源地黃病毒分離株 RG1 病毒抗體反應。

Fig. 4. Analyses of capsid protein of purified virus stored in leaves of *Chenopodium quinoa* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (A) and western blot (B). Lanes M are standard markers for molecular weights; Lanes H are sample of healthy control; Lanes 1 and 2 are partial purified *Rehmmania* virus. The arrow indicates the location of capsid protein subunit. In Western blot (B), the homogenous antibody against *Rehmmania* virus was applied.



圖五、免疫雙擴散反應測定地黃病毒分離株 RG1 病毒與胡瓜嵌紋病毒 (CMV)：煙草嵌紋病毒 (TMV) 之血清類源關係。試驗時中央穴別加入 RG1 分離株抗血清，周圍各穴則分別加入供試的病毒抗原，包括地黃病毒 RG1 分離株、地黃健康株及煙草嵌紋病毒分離株為對照。

Fig. 5. Serological relationships between *Rehmannia* virus isolate RG1 and *Tobacco mosaic virus* (TMV) or *Cucumber mosaic virus* (CMV) as determined by Ouchterony immunodiffusion. In the tests, antibodies of *Rehmannia* virus isolate RG1 were loaded in the central wells, while the viral antigens (RG1, TMV, and CMV) and the healthy control (H) were added in the peripheral wells separately.

PCR 後獲得一約 0.5 k bp 之小片段 DNA 產物。然而由結果得知以病毒 RNA 為模版，可獲得一內含預期小片段 DNA 產物之 0.9 k bp 的 DNA 片段 (圖六)。

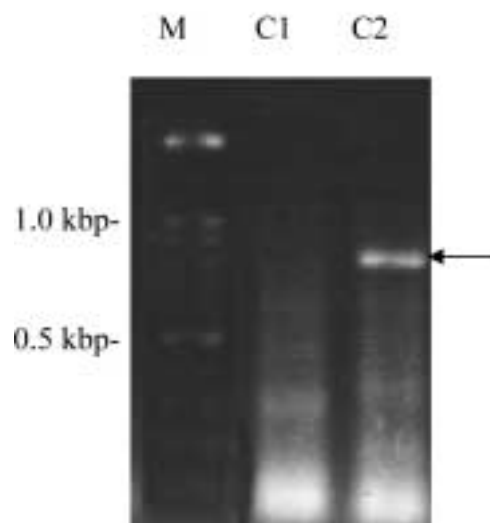
(二) 核酸片段選殖和核酸序列分析

利用藍白菌落反應初步選出可能含有嵌入序列之選殖菌株，由微量質體純化，經洋菜膠體電泳分析，進一步選出確定之轉型菌株可能含有嵌入序列之選殖菌株 3 個，從本病毒 RNA 3' 端解序 480 個核苷酸。將此序列利用 GCG Wisconsin Package 的 Blast 及 FastA 程式，與 GenBank 上已正式登錄的核苷酸序列進行相同性百分率比對，得知與 *Tobacco mosaic virus* (Accession No. AY555269 complete cds) 的鞘蛋白基因之核苷酸相同度高達 97.1% (圖七)，而其胺基酸相似度為 99.4%，再以其中的序列分析程式 Pileup 及 Prettybox 進行核酸、胺基酸的差異性比對與呈現如 (圖八)，顯示出兩者之間在 CP gene 極為相近，自成一個分支 (clade)，進一步分析與不同寄主上已知的 TMV 系統 (strain) 之

間的親源關係，得知與感染地黃的 TMV 親源關係較近 (圖九)。

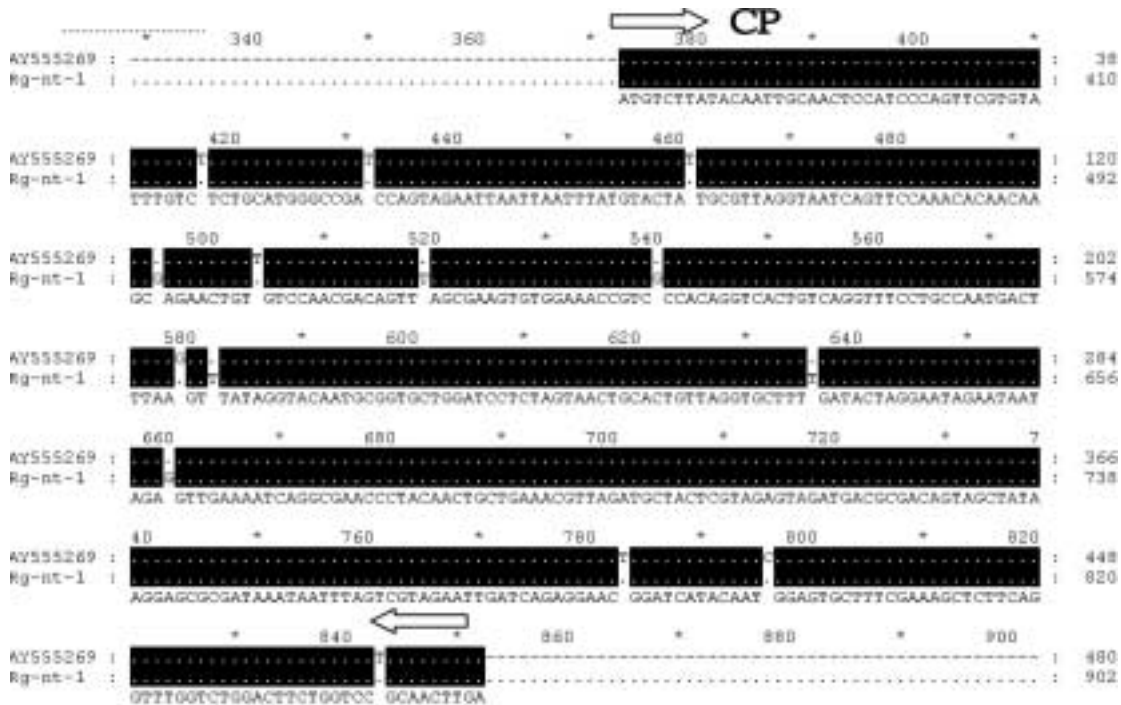
討 論

比較病毒 CP gene 序列的結果，顯示台灣地黃病毒分離株 RG1 與 2004 年江氏⁽¹⁸⁾ 發表感染中國河南地黃的 TMV 之核酸序列相同度高達 97.1% (圖七)，胺基酸序列相同度高達 99.7% (圖八)，只有一個胺基酸的差異。由此可知，二者的親源關係極接近，甚至可能出自同一個來源。將 RG1 的 CP gene 序列與來自於感染菸草⁽¹⁹⁾、蠶豆^(3, 19, 20) 的 TMV 及蕃茄⁽¹²⁾ 的嵌紋病毒 (ToMV) 比對 (圖九)，其核酸序列相同度皆低於 83%，胺基酸序列相似度亦皆低於 82%，與前三者比較有明顯的差異，因此 RG1 與感染地黃的 TMV 顯然可以從其中獨立出來成爲一個系統 (strain)。由於寄主篩選的效應，造成 TMV 品系間的差異，進一步將 RG1 的 CP gene 核酸序列與 2002 年李氏發表感染毛地黃 (*Rehmannia elata*) 的 TMV (Accession No. AY140898.1) 序列比對，顯示核酸序列相同度高 86%，胺基酸序列



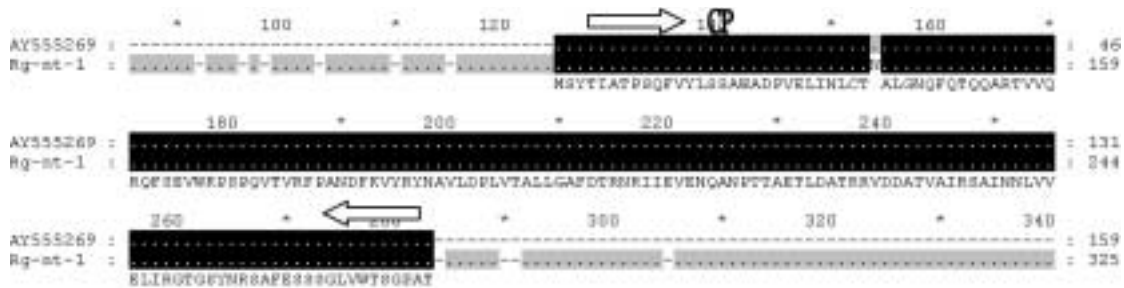
圖六、地黃病毒分離株 RG1 以專一性引子對 (Reh-F, Reh-R) 進行鞘蛋白基因核苷酸序列反轉錄聚合酶鏈鎖反應之試驗：結果合成之核酸經電泳分析，片段大小如箭頭所指，C1 及 C2：二次不同部分純化之病毒試液為試料。

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis analysis of the results of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primer (Reh-F, Reh-R) to amplify the capsid protein gene of *Rehmannia* virus isolate RG1. Lane M, molecular size markers. Lanes C1 and C2, RT-PCR product using two samples as templates derived from twice partially purified. The amplified RT-PCR product is indicated by the arrow on the right.



圖七、地黃病毒分離株 RG1 (Rg-nt-1) 與煙草嵌紋病毒 (AY555269) 外鞘蛋白基因核苷酸序列比對之結果。兩者 CP 基因的核苷酸序列相同者以黑色背景的白點表示，比對的下方序列為相同保留核苷酸序列。白色箭頭指示鞘蛋白基因部位。

Fig. 7. Comparison of the coat protein (CP) gene nucleotide sequences of *Rehmmania virus* isolate RG1 (Rg-nt-1) and *Tobacco mosaic virus* (AY555269). The CP open reading frame was indicated by the white arrows. Nucleotides identical to the consensus sequence (under the alignment) were represented by a dot with black background.

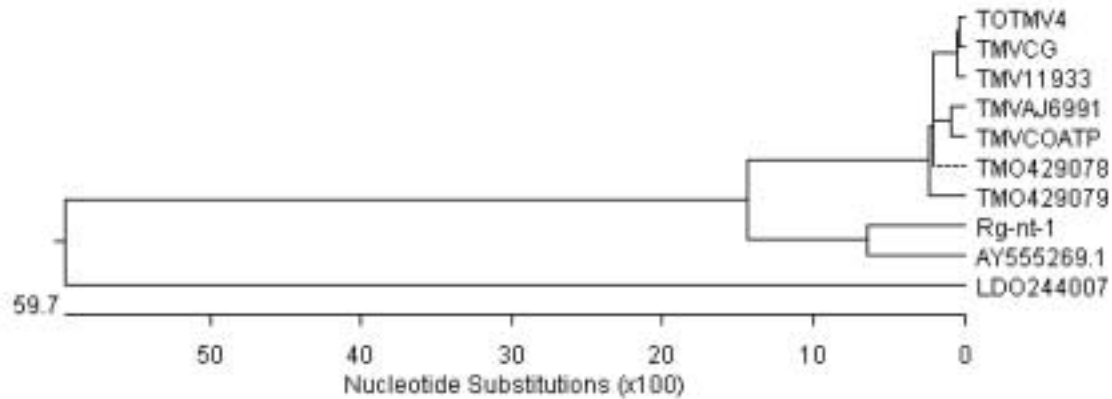


圖八、地黃病毒分離株 RG1 (Rg-nt-1) 與煙草嵌紋病毒 (AY555269) 外鞘蛋白胺基酸序列比對之結果。兩者 CP 基因的胺基酸序列相同者以黑色背景的白點表示，比對的下方序列為相同保留胺基酸序列。白色箭頭指示鞘蛋白基因部位。

Fig. 8. Comparison of coat protein amino acid sequences of *Rehmmania virus* isolate RG1 (Rg-nt-1) and *Tobacco mosaic virus* (Access No. AY555269). The coat protein (CP) region was indicated by the white arrows. Amino acids identical to the consensus sequence (under the alignment) were represented by a dot with black background.

相同度達 91 %，可以初步推知感染同一屬 *Rehmmania* 植物的 TMV 其親源關係高於感染不同屬植物的 TMV。由雙向免疫擴散反應試驗得知，來自煙草的 TMV 與地黃 RG1 病毒分離株的抗血清，由於兩者核酸序列與胺基酸序列差異性高，呈現微弱沈澱反應。Culver 氏 1994 年報告 TMV 的鞘蛋白胺基酸改變誘引煙草寄

主本身 HR gene 啟動⁽⁵⁾，進而干擾 TMV 次蛋白單位 (subunit) 排列的次序，使原本對寄主由致病性變為過敏性。因此，TMV 在地黃中可能為了能更適應寄主體內的環境達到長期感染的目的，產生核酸變異或者外鞘蛋白結構空間的改變。因此感染地黃 TMV 的分類地位及與其他株系的親緣關係，實有待進一步探討的必



圖九、地黃病毒分離株 RG1 (Rg-nt-1) 氨基酸序列與感染不同寄主的菸草嵌紋病毒之親源關係比對之結果。樹狀圖中虛線的部分代表負的分支長度，係由於取平均數所造成的常見結果。(TOTMV4, Acce. No.: V01408; TMVCG, Acce. No.: X68110; TMV11933, Acce. No.: AJ011933; TMVAJ6991, Acce. No.: AJ006991; TMVCOATP, Acce. No.: Z96945; TMO429078, Acce. No.: AJ429078; TMO429079, Acce. No.: AJ429079; AY555269.1, Acce. No.: AY555269; LD0244007, Acce. No.: AJ244007)

Fig. 9. Phylogenetic tree derived from the deduced amino acids of complete CP coding region of representative *Tobacco mosaic virus* strains registered in NCBI. Below the tree is a scale indicating the number of "Nucleotide Substitutions" for both DNA and protein sequences. A dotted line on a phenogram indicates a negative branch length, a common result of averaging. (TOTMV4, Acce. No.: V01408; TMVCG, Acce. No.: X68110; TMV11933, Acce. No.: AJ011933; TMVAJ6991, Acce. No.: AJ006991; TMVCOATP, Acce. No.: Z96945; TMO429078, Acce. No.: AJ429078; TMO429079, Acce. No.: AJ429079; AY555269.1, Acce. No.: AY555269; LD0244007, Acce. No.: AJ244007)

要。

由雙向免疫擴散反應試驗結果顯示，地黃 RG1 病毒分離株的抗血清與地黃 RG1 分離株病毒反應帶出現靠近抗體穴，並向中央抗體穴彎曲，可以推知由地黃 RG1 病毒分離株製備抗血清過程中的 RG1 病毒抗原，在純化過程中病毒顆粒有裂解現象發生，導致所產生的抗體 IgG 的分子量比未裂解者大。因此在雙向免疫擴散反應過程中，抗原分子量小於抗體 IgG 的分子量，導致抗原在瓊脂中擴散比抗體快，所以反應帶出現在靠近抗體穴處。

地黃利用塊根行無性繁殖，母株感染的病毒可經由塊根傳入子代，造成子代幼苗就成為帶毒的植株，影響日後的生長及病勢的擴散，帶毒的塊根更可在人為操作下無遠弗界到處傳播。2004 年江氏⁽¹⁸⁾ 在河南發表有關病毒感染地黃的報告，其中 TMV 是主要病原。本報告的 TMV 與其親源關係極接近，推測病毒也是在引進種源時，由感染的塊根夾帶進來。台灣地區所種植的地黃，若以前是單一來源恐有全面感染的可能，此有待繼續追蹤。且因受 TMV 感染的地黃，其藥效成分是否仍然相同，皆需進一步探討。在此種情形下益發襯托出使用健康地黃母株在病害管理方面的重要性，因其不僅能防止病害的蔓延，而且健康種苗又可增加植株的生長勢及增加產量。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Ahmad, I. B., and Scott, H. A. 1984. An improved immunodiffusion test for the detection of intact cucumber mosaic virus in crude sap. *Phytopathology* 74:1097-1100.
2. Chang, C. A., Purcifull, D. E., and Zettler, F. W. 1990. Comparison of two strains of peanut stripe virus in Taiwan. *Plant Dis.* 74:593-596.
3. Chen, Q., Zhou, X., Xue, C., and Li, D. 1999. Molecular cloning and sequence analysis of the movement protein gene of tobacco mosaic virus isolated from broad bean. *Journal of Zhejiang Agricultural University* 25: 239-242.
4. Christie, S. R., Edwardson, J. R., and Zettler, F. W. 1968. Characterization and electron microscopy of a virus isolated from *Bidens* and *Lepidium*. *Plant. Dis. Repr.* 52: 763-768.
5. Culver, J. N., Stubbs, G. and Dawson, W. O. 1994. Structure-function relationship between *Tobacco mosaic virus* coat protein and hypersensitivity in *Nicotiana glauca*. *J. mol. Biol.* 242: 130-138.
6. Dijkstra, J., and de Jager, C. P. 1998. *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises*. Springer-Verlag Berlin; Heidelberg. 279-280 pp.
7. Ding, T. M. 2001. The key technique to grow herbal

- and animal medicine plants. Chinese Chinese medicine medicine publisher. P: 2-20. (in Chinese)
8. Goelet, P., Lomonosoff, G. P., Butler, P. J., Akam, M. E., Gait, M. J. and Karn, J. 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 5818-5822.
 9. Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein blotting. Pages 165-178 *in: Methods in Molecular Biology Vol. 1. Protein*. P: 165-178.
 10. Hall, C. E. 1964. Electron microscopy: principles and application to virus research. Pages 253-266 *in: Corbett, M.K., Sisler, H.D. eds. , Plant virology*, Univ Florida Press, Gainesville,.
 11. Huang, C. H., Hseu, S. H., and Chao, Y. J. 1986. Purification and serology of an isolate of zucchini yellow mosaic virus. J. Agri. Res. of China 34: 495-503.
 12. Koh, H. K., Song, E. K., Lee, S. Y., Park, Y. I., and Park, W. M. 1992. Nucleotide sequence of cDNA of the tobacco mosaic virus RNA isolated in Korea. Nucleic Acids Res. 20: 5474.
 13. Letschert, B., Adam, G., Lesemann, D., Willingmann, P. and Heinze, C. 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. J. Virol. Methods 106: 1-10.
 14. Milne, R. G., and Luisoni, E. 1977. Rapid immunoelectron microscopy of virus preparations. Method Virol. 6:265-281.
 15. Wang, K. T and Fang, J. 2002. The key technique to grow the Chinese herbal medicine plants. Jiangsu science technique publisher. P: 271-307. (in Chinese)
 16. Wang, M., Lin, I. F., Huang, L. Q. Chen, Y. F., Wu, Z. G., Li, G. F., Weim, E. S. and Fang, R. X.. 2006. TMV and CMV widely infect cultivated *Rehmannia glutinosa* Libosch. Acta Phytopathological sinica 36(2): 189-192.
 17. Yang, W. P. and Wang, G. Y. 2002. The Chinese herbal medicine book. Chinese medicine ancient works publisher. Beijing. P: 57-58. (in Chinese)
 18. Zhang, Z. C., and Zhang, L. F. 2004. Identification of the viral pathogens of *Rehmannia glutinosa* disease in Henan Province. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences. Vol.3: 340-348 .
 19. Zhou, X., Xue, C., Chen, Q., Qi, Y. and Li, D. 2000. Complete nucleotide sequence and genome organization of tobacco mosaic virus isolated from *Vicia faba*. Sci. China, C, Life Sci. 43: 200-208.
 20. Zhou, X., Liu, Y., Xue, C. and Li, D. 1997. cDNA sequence analysis of coat protein gene and its 3' non-coding region of TMV faba strain. Ping Tu Hsueh Pao 13: 240-246 .

ABSTRACT

Liao, J. Y.¹, Hu, C. C.², Kao, J. L.³, and Deng, T.-C.^{1,4}. 2007. Identification of *Tobacco mosaic virus* infecting *Rehmannia glutinosa* Plant Pathol. Bull. 16: 61-69. (¹Plant Pathology Division, Agriculture Research Institute, Council of Agriculture, Wufong, Taiwan; ²Graduate Institute of Biotechnology, National Chung Hsing University; ³Agronomy Division, Agriculture Research Institute, Council of Agriculture, Wufong, Taiwan; ⁴Corresponding author, Email:tcde@wufeng.tari.gov.tw ; FAX: +886-4-23338162)

Rehmannia glutinosa being a kind of medicinal plant cultivated in Taiwan was found to be infected by viruses. A plant with leaf mosaic was collected from Puli, and from which a pure line of virus isolate (RG1) was obtained through series of single lesion isolation. By host range test, electron microscope observation, immunosorbent electron microscopy, Ouchterlony immunodiffusion, coat protein electrophoresis, western blot analysis, and nucleotide sequencing, and analyses, the virus was identified as a isolate of *Tobacco mosaic virus* (TMV). The virus systemically infects *Rehmannia glutinosa* and causes mosaic symptom, but locally infects *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* and *Nicotiana tabacum* cv. Vam-Hicks and caused necrotic lesions. Direct negative staining by electron microscopy observation of diseased tissue revealed the presence of rod-shaped virus particles, around 300-310×16-18 nm. The virus was purified from inoculated leaves of *C. quinoa* by isopycnic centrifugation in cesium sulfate and the purified preparation was used to inject rabbit for antiserum production. The virus was found consisting of one species of coat protein subunit with an estimated molecular weight of 19 kDa. In Ouchterlony immunodiffusion and western blot analyses, the prepared antiserum reacted with homologous TMV antigens. The 3' - terminal 1044 nucleotides of this virus were cloned, sequenced and compared with corresponding sequences of representative *Tobacco mosaic virus* strains listed in public databases. It was found that this virus is most closely related to the *Tobacco mosaic virus* reported in China (Accession No. AY555269), with nucleotide and amino acid sequence identities of 97.1 % and 99.4 %, respectively. This is the first report of *Tobacco mosaic virus* infecting *Rehmannia glutinosa* in Taiwan.

Key words: *Rehmannia glutinosa*, *Tobacco mosaic virus*, symptom, antiserum, sequence comparison