

## 草莓潛隱輪斑病毒感染葵百合之分子生物學證據

張清安<sup>1,2</sup>、林玫珠<sup>1</sup>、陳金枝<sup>1</sup>、鄧汀欽<sup>1</sup>、廖吉彥<sup>1</sup>

1. 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會 農業試驗所 植物病理系
  2. 聯絡作者，電子郵件:cachang@wufeng.tari.gov.tw；傳真:04-23331089
- 接受日期：90年3月15日

### 摘 要

張清安、林玫珠、陳金枝、鄧汀欽、廖吉彥。2001。草莓潛隱輪斑病毒感染葵百合之分子生物學證據。植病會刊 10:55-64。

草莓潛隱輪斑病毒 (*Strawberry latent ringspot virus*, SLRSV) 是一種可以藉由機械性傷口及線蟲傳播的病毒，國內並未有其發生之紀錄。本研究室於 1999 年偶然發現此病毒發生於種球由荷蘭進口之葵百合 (cv. Stargazer) 植株，由於該植株葉片呈現與感染百合斑紋病毒 (*Lily mottle virus*, LiMV) 雷同之系統性嵌紋病徵，因此當時嘗試以對多數 potyviruses 具廣效性之引子對，進行反轉錄聚合連鎖反應 (RT-PCR) 進行確認，卻發現有一樣品並未如預期產生 2.0 kb 大小之核酸片段，反而出現大小僅為 0.7 kb 之核酸產物 (P700)。此產物經選殖及定序分析發現其序列與 SLRSV RNA2 之 3' 端非轉譯區 (non-translated region, NTR) 序列 (X75165, Everett *et al.*, 1994) 達到 90% 以上之相同度，因此根據已知 SLRSV 之 RNA2 核酸序列設計一對可以增幅出涵蓋完整鞘蛋白基因之引子對，就同一田間樣品再度進行 RT-PCR 反應，結果增幅出四個 DNA 產物，其中一個大小為 2.7 kb 之產物經選殖及解序後獲得一全長含 2763 個核苷酸之序列 (Tw26)。解析此序列發現其只含有一個轉譯架構，可對應一個含 870 個胺基酸 (aa) 之複合蛋白，推測此複合蛋白可於胺基酸 247-248 及 635-636 等二個位置上發生裂解，產生三個分別可能為 247 aa 之未知蛋白 (UNP)、388 aa 之大鞘蛋白 (LCP) 及 235 aa 之小鞘蛋白 (SCP)，複合蛋白之後有 56 個核苷酸之 NTR。此種基因架構與文獻上所述 SLRSV RNA2 者符合，唯 NTR 部份較已知者短，可能仍未完整。故進一步利用已知的 P700 與 Tw26 序列重新設計引子對進行選殖，終於獲得涵蓋全長 NTR 之 Tw-ntr3 序列。將 Tw-ntr3 與 Tw26 序列合併後獲得一全長 3224 bp 之核酸片段 (SLR-TW-R2)。進行序列分析後發現，在已登錄的二個 SLRSV RNA2 序列中 SLR-TW-R2 與 Everett *et al.* (1994) 所報告之 X75165 序列在核酸層次上達到 84% 之相同度，而胺基酸層次之相同度甚至高達 96% 以上。SLR-TW-R2 與 Kreiah *et al.* (1994) 所報告之 X77466 序列雖然在核苷酸相同度上略低，約為 70-78%，但二者在 LCP 之胺基酸序列上相同度高達 96.4%，此一分子生物學證據顯示 SLR-TW-R2 序列應源自於一種與 SLRSV 親緣極為接近的病毒或系統，同時亦呼應過去以色列學者所提出 SLRSV 可以感染百合之生物學發現。

關鍵詞：百合、草莓潛隱輪斑病毒、RNA2、序列分析

### 緒 言

百合 (*Lilium* spp.) 為近年來廣受全球各地消費者喜愛之球根花卉，其栽培產業在我國發展亦極為快速<sup>(5)</sup>。台灣雖為部份百合種類之原生地<sup>(5)</sup>，但大量經濟生產所需之種球絕大多數均由國外進口，其中尤以自荷蘭進口者佔最大宗<sup>(3,5)</sup>。依據前台灣省政府農林廳之評估，對百合產業影響最大的應屬無法以藥劑治療的病毒病<sup>(2,3)</sup>。感染病毒之百合生長緩慢、植株矮化、開花數、花期與品質均會受到影響，而且病毒可潛伏於種球而繼續遺害後代植株，因此

若球根之帶病毒比率過高，將直接影響所生產切花之品質與產量<sup>(2,10)</sup>。文獻資料上共有 12 種病毒可危害百合<sup>(2,3,10)</sup>，但最具經濟危險性且被荷蘭列為種球生產時需進行例行檢定之對象病毒包括百合隱微型病毒 (*Lily symptomless virus*, LSV)，胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)，百合斑紋病毒 (*Lily mottle virus*, LiMV)，鬱金香條斑病毒 (*Tulip breaking virus*, TBV) 及百合 X 病毒 (*Lily virus X*, LVX) 等五種<sup>(10)</sup>。上述五種病毒中除 LVX 外均已陸續被證實發生於國內栽培之百合上<sup>(2,3,4)</sup>。民國 88 年筆者等於后里地區所栽植之葵百合 (cv. Stargazer) 上發現部份呈現嵌

紋病徵之植株組織內存在尚未被證實發生於國內之草莓潛隱輪斑病毒 (*Strawberry latent ringspot virus*, 簡稱 SLRSV) 之核酸分子, 在後續之實驗中進一步由同一樣品中選殖出一段達 2.7 kb 的核酸分子, 最後證實該分子之基因架構及蛋白質訊息均與文獻上所登錄之 SLRSV 之 RNA2 相符<sup>(1)</sup>。以色列學者曾於 1995 年首次提出 SLRSV 可以感染百合之生物學證據<sup>(9)</sup>。據我們的了解本研究結果乃文獻上首次呈現 SLRSV 確實存在於百合組織之分子生物學證據。

## 材料與方法

### 材料來源與保存方式

供試之百合感病材料乃由台中縣神岡鄉及后里鄉所蒐集而來, 品種包括香水(cv. Casa Blanca)、葵(cv. Stargazer)、阿卡(cv. Acapulco)及馬可(cv. Marcopolo)等。所蒐集之植株葉片均呈現輕重不等之斑紋(mottling)或嵌紋(mosaic)病徵。其葉片由田間採回後除立即進行各項試驗外, 部份則切成 1 cm<sup>2</sup> 小塊浸漬於 50% glycerol 溶液中並保存於 -20 下, 作為長期保存材料。

### 抗血清來源與酵素連結免疫分析法

本試驗所使用之百合病毒抗血清, 包括對應 LiMV<sup>(4)</sup>、LSV<sup>(4)</sup> 及 CMV<sup>(4)</sup> 等三種, 均為本研究室自行製備, 三者均以純化之病毒顆粒免疫注射於家兔體內所製作而成, 病毒純化步驟與抗血清製作方法已於過去之報告中述明<sup>(4,6,7,8)</sup>。試驗中所採用之酵素連結免疫分析法 (ELISA) 係依照間接式 (antigen-coating indirect ELISA) 程序進行, 其流程請詳見已發表之報告<sup>(7,8)</sup>。評定反應結果乃依健康百合對照樣品在 405 nm 下之平均吸光度 (absorbance) 之二倍值作為臨界點, 樣品之吸光度超出此臨界點範圍者即認定其為感染病毒之樣品。

### 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

取 0.15-0.2g 病葉於液態氮中研磨成粉, 再以植物全量 RNA 純化試劑組 (QIAGEN, GmbH, Germany) 依廠商建議之程序進行供試樣品全量 RNA 之純化。其次利用 Stratagene 反轉錄試劑組 (Stratagene Inc., La Jolla, CA) 取 3 µl 之 RNA 進行反轉錄反應 (Reverse transcription) 以獲得互補股 cDNA, 供聚合酶連鎖反應 (PCR) 分析之用。進行 PCR 反應時, 於每一 50 µl 反應液中分別加入 2 µl cDNA、5 µl 10 x PCR buffer、4 µl 2.5 mM dNTP、0.5 U Ex-Taq polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)、及各 2.5 µl 20 µM 之引子對, 於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中進行 26 個 PCR 循環反應。

## 基因選殖與分析

本研究中所有選殖經 PCR 增幅之核酸產物之程序均先以 QIAquick Kit (QIAGEN GmbH, Germany) 所指示之程序將 DNA 產物加以純化, 再依照廠商所提供之步驟將其選殖於 pCRII-TOPO 載體上 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA) 並轉殖於大腸桿菌中, 接著以篩選性培養基及限制酵素切割篩選具有標的產物之轉殖株, 送交明欣生物技術公司 (Taipei, Taiwan) 進一步以 ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀 (Perkin-Elmer, CA, USA) 及其配用之非放射性標幟反應試劑組 (ABI PRISM BioDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) 進行核苷酸序列分析, 分析所得並以 Scan DNASIS 核酸序列分析軟體 (Hitachi Software Engineering America, Ltd., California, USA) 進行分析比對。

## 結 果

### 田間百合樣品之 RT-PCR 分析

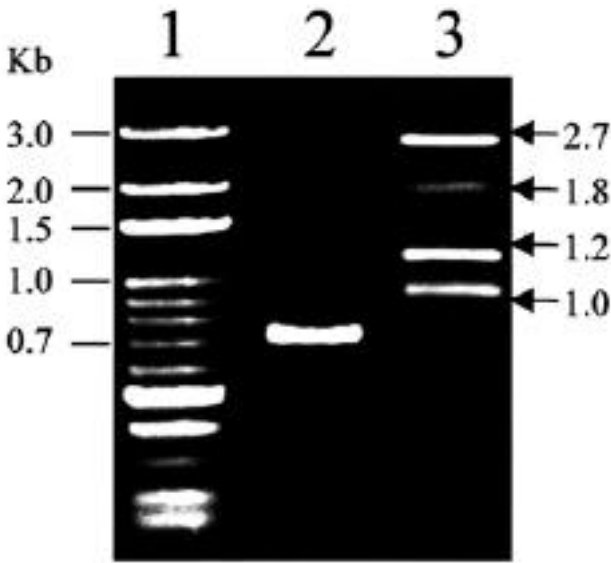
本研究室在 1999 年例行之病害調查中應用 ELISA 檢測蒐集自后里及神岡地區之百合標本, 發現代號 10、11、30、32、33 及 35 之樣本其葉片上具明顯斑紋 (mottle) 病徵, 但與 LSV 及 CMV 之抗體不反應, 而僅與 LiMV 有介於正負反應臨界值間之微弱反應。因此我們利用 LiMV 專一性引子對<sup>(4)</sup> 進行此等樣品之 RT-PCR 反應, 結果均無發現有符合預估值 800 bp 之核酸片段<sup>(4)</sup> 出現, 顯示上述樣品組織中並無 LiMV 之存在。接著我們以對應 *Potyvirus* 屬之廣效性引子對 Pot1/Pot2<sup>(15)</sup> 就此等樣品進行 PCR 反應, 結果其中 No.10 之樣品可增幅出一 700 bp 之產物 (Fig 1, Lane 2), 故將此 700 bp 之片段回收並選殖於 pCRII-TOPO 載體上, 獲得一轉殖株 (P700)。

### 轉殖株 (P700) 之核酸序列分析

我們將 P700 送往明欣生技公司, 以自動核酸定序儀分析解讀其核酸序列並與 Genbank 中所有基因比對, 發現此片段之 3' 下游約 440 bp 之核酸序列與已知 SLRSV RNA 2 之 3' 端非轉譯區之序列達到 90% 以上之核苷酸相同度 (identity), 顯示 P700 序列可能源自於 SLRSV 之感染。

### SLRSV 相關核酸之分離與鑑定

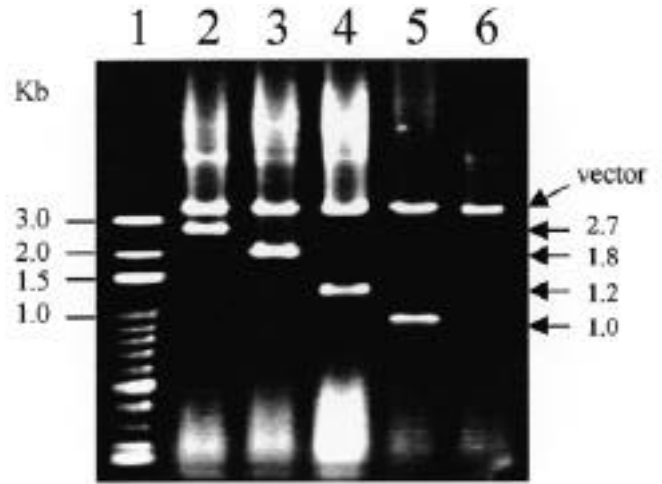
上述實驗結果顯示台灣百合植株中可能存在國內尚未發現之 SLRSV, 故根據 Genbank 中已登錄之 SLRSV 核酸序列, 設計一對對應 SLRSV 之專一性引子 SLRSV-up (5'-GTT TCA TGA GGA TTT GGT-3') 及 SLRSV-dw (5'-CCA TCT GGG CCA GGG ATA-3'), 並以田間樣品 No.10 之 RNA 為模版進行 RT-PCR (Fig. 1, Lane 3), 結果獲得四個



圖一、利用對應 Potyviruses 之廣效性引子對 (Pot1/Pot2) 及對應草莓潛隱輪斑病毒 (SLRSV) RNA2 之引子對 (SLRSV-up/SLRSV-dw) 就田間葵百合 No.10 樣品進行 RT-PCR 分析之結果。Lane 1, 標準 100 bp DNA 梯級標誌; Lane 2, 以 Pot1 及 Pot2 引子對進行 RT-PCR 反應所得之 0.7 Kb 產物 (P700); Lane 3, 以 SLRSV-up 及 SLRSV-dw 引子對進行 RT-PCR 反應所得之四個不同分子量產物。

**Fig. 1.** Result of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using a pair of *Potyvirus*-specific degenerate primer (Pot1/Pot2) and a primer pair designed for specific amplification of *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) RNA-2 (SLRSV-up/SLRSV-dw) to react with Stargazer lily sample No. 10. Lane 1, 100 bp DNA ladder markers; Lane 2, a 0.7 Kb DNA product (P700) amplified by Pot1/Pot2 primers in RT-PCR; Lane 3, four DNA products (2.7, 1.8, 1.2, and 1.0 Kb) were amplified by SLRSV-up/SLRSV-dw primers in RT-PCR.

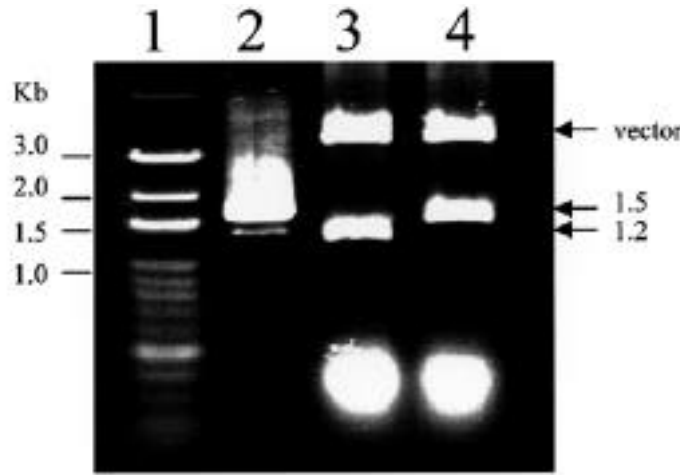
大小不等之核酸產物，將這些產物選殖於 pCRII-TOPO 載體得到代號為 Tw26, Tw55, Tw39 及 Tw62 等四個轉殖株 (Fig. 2)。將上述四種轉殖株之嵌入序列分別進行定序分析，發現其中分子量最大的之 Tw26 為一具有單一轉譯架構 (open reading frame) 之核酸序列，而其餘三個均為分子量較小且不完整之片段。分析該轉譯架構發現可對應一個含 870 個胺基酸 (aa) 之複合蛋白，起始碼位於第 95-97 之核甘酸位置上，第一個終止碼則出現於第 2705-2707 之核甘酸位置上。預測之複合蛋白可於胺基酸 247-248 及 635-636 等二個位置上發生裂解，產生三個分別為 247 aa 之未知蛋白 (unknown protein, UNP)、388 aa 之大鞘蛋白 (large coat protein, LCP) 及 235 aa 之小鞘蛋白 (small coat protein, SCP)。此種架構與文獻上所記錄之 SLRSV RNA2 完全相同<sup>(11,13)</sup>。另外 Tw26 序列除上述轉譯架構外其 3' 端後有 56 個核甘酸非轉譯區 (non-translated region, NTR)，不過與已知之 SLRSV 序列相較，其 NTR 尚不完整。為獲得完整之



圖二、利用對應草莓潛隱輪斑病毒 (SLRSV) RNA2 之引子對 (SLRSV-up/SLRSV-dw) 就田間葵百合 No.10 樣品進行 RT-PCR 所增幅之四個不同分子量核酸產物 (見圖一) 經分別選殖於 pCRII-TOPO 載體後之電泳分析結果。四個產物分別選殖於 pCRII-TOPO 載體後轉型於 *E. coli* 宿主中，經篩選後分別得到編號為 Tw 26, 55, 39 及 62 等四個轉型株，此等植入序列經分別以限制酵素 *EcoRI* 剪切，再以電泳進行分析。Lane 1, 標準 100 bp DNA 梯級標誌; Lane 2-5, 分別為轉型株 Tw 26, Tw 55, Tw 39 及 Tw 62 之分析結果; Lane 6, 未植入任何序列之對照 pCRII-TOPO 載體。

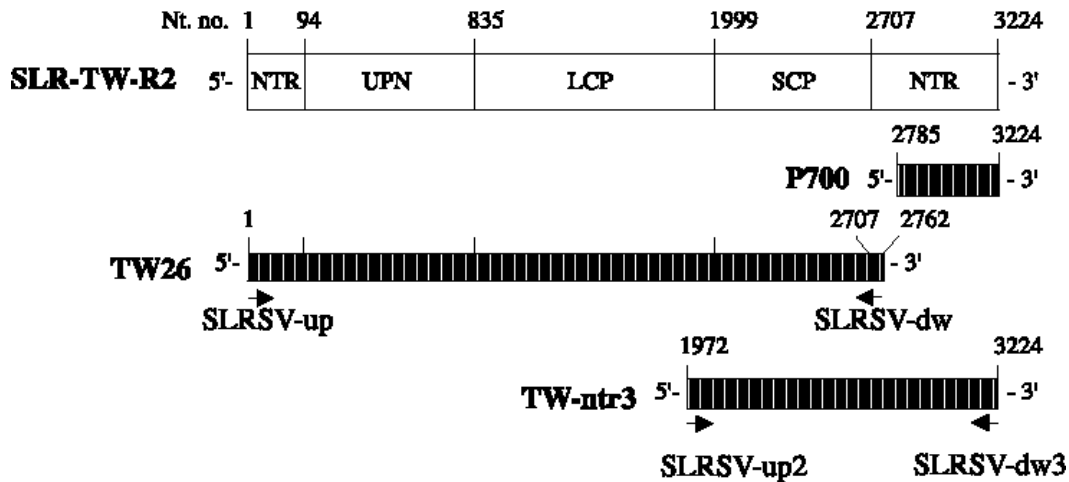
**Fig. 2.** Electrophoresis analyses of four bacterial clones transformed with pCRII-TOPO plasmid separately inserted by four different products amplified by *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) RNA-2-specific primers (SLRSV-up/SLRSV-dw) from a Stargazer lily plant in Taiwan. Inserted plasmids were separately purified and digested with restriction enzyme *EcoRI* before analyzing by electrophoresis. Lane 1, 100 bp DNA ladder markers; Lane 2-5, analysis of bacteria clone no. Tw 26, Tw 55, Tw 39 and Tw 62, respectively; Lane 6, control pCRII-TOPO plasmid without inserted sequence.

3' 端 NTR 序列，我們進一步根據現有已知之 Tw26 及 P700 序列設計出 SLRSV-up2 (5'-AAT CCG GCA ACG ACC ATG GTA G-3') 及 SLRSV-dw3 (5'-GTG CCA GAA CTA GAC CCG GTA A-3') 引子對進行 RT-PCR (Fig. 3)，所增幅出之 PCR 產物選殖後得到 Tw-ntr9 及 Tw-ntr3 二個轉殖株 (Fig. 3)。此二轉殖株之嵌入序列經核酸定序後發現其中 Tw-ntr3 具有完整之 NTR 序列。故將 Tw26 及 Tw-ntr3 之序列合併後獲得一全長 3224 bp 之核酸片段 (SLR-TW-R2) (Fig. 4)，其核甘酸及預測之胺基酸序列如 Fig. 5 所示。此序列與 Genbank 中現有已登錄之二種 SLRSV RNA2 之核酸及蛋白質序列 (X75165, X77466)<sup>(11,13)</sup> 比對，其結果標示於 Fig. 7。SLR-TW-R2 與 X77466 在 UNP、LCP、SCP 及 NTR 四個位置上二者間之核甘酸相同度 (identities) 介於 70.6%-83.8%，但二者在 UNP、LCP 及 SCP 三個蛋白間胺基酸序列之相同度則介於 74.4%-96.4%，尤其在 LCP 上有



圖三、利用分析所獲之 P700 與 Tw26 二片段之序列所設計之引子對 (SLRSV-up2/SLRSV-dw3) 以田間葵百合 No.10 樣品之全量 RNA 為模版進行 RT-PCR 反應並將其增幅產物選殖於 pCRII-TOPO 載體之結果。PCR 反應獲得 1.5 與 1.2 Kb 等二個產物分別選殖於 pCRII-TOPO 載體，再轉型於 *E. coli* 宿主中，經篩選後獲得 Tw-ntr3 與 Tw-ntr9 等二個轉型株，其植入序列經分別以限制酵素 *EcoRI* 剪切，再以電泳進行分析。Lane 1, 標準 100 bp DNA 梯級標誌；Lane 2, 以 SLRSV-up2/SLRSV-dw3 引子對就葵百合 No.10 樣品進行 RT-PCR 反應之結果；Lane 3 與 4 分別為轉型株 Tw-ntr3 與 Tw-ntr9 之電泳分析結果。

Fig. 3. Electrophoresis analyses of DNA products amplified by SLRSV-up2/SLRSV-dw3 primers designed for obtaining complete sequence of non-translated region. Total RNA extracted from No. 10 sample of Stargazer lily was used as RNA template in the RT-PCR reaction. The two PCR products (lane 2) were separately cloned into pCRII-TOPO plasmid and transformed in *E. coli*, and two clones (Tw-ntr3, Tw-ntr9) were obtained. Inserted plasmids were separately purified and digested with restriction enzyme *EcoRI* before analyzing in electrophoresis. Lane 1, 100 bp DNA ladder markers; Lane 2, PCR products amplified by SLRSV-up2/SLRSV-dw3 primers; Lane 3 and 4 are analyses of the inserted sequence in bacteria clones of Tw-ntr3 and Tw-ntr9, respectively.



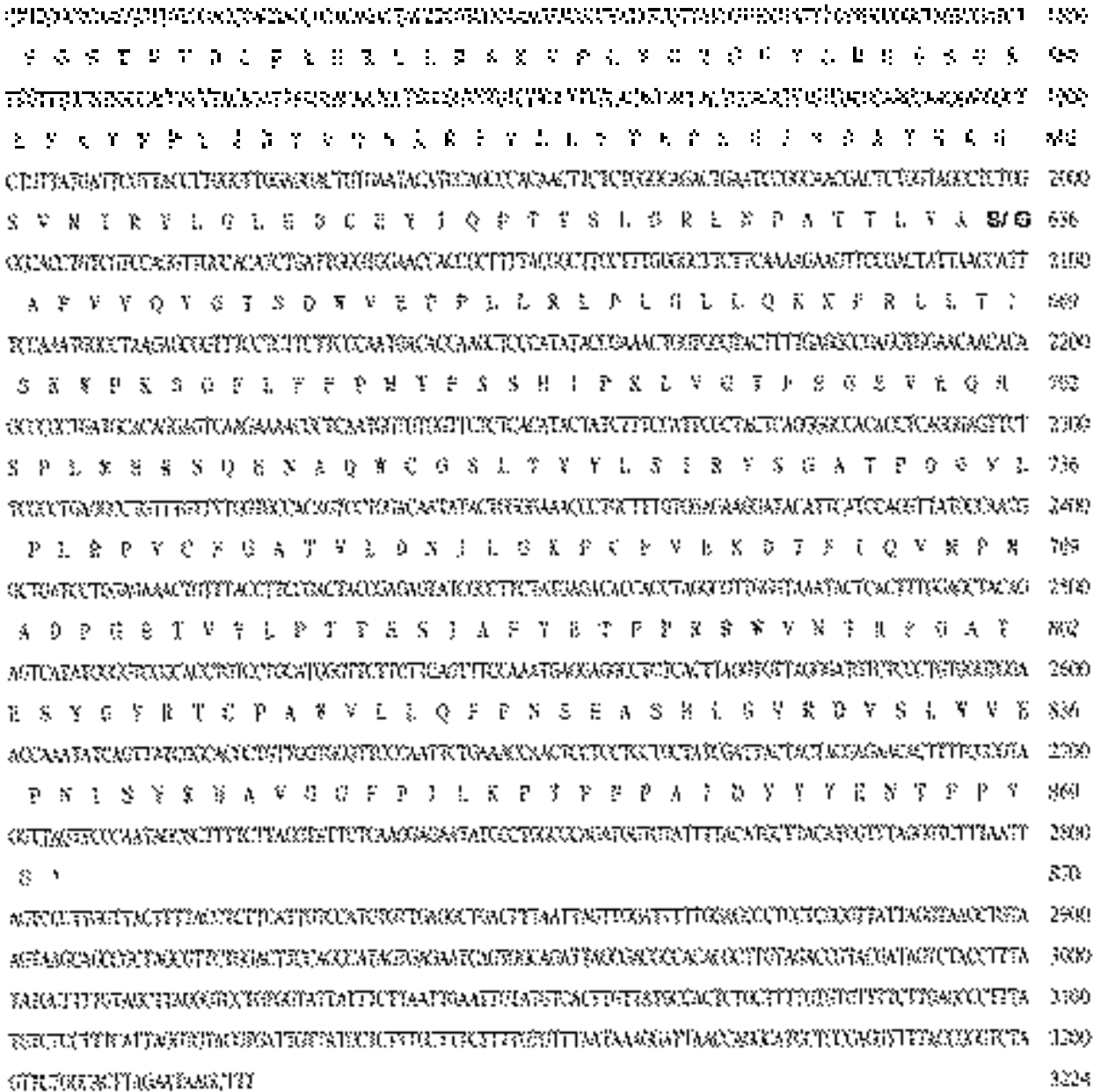
圖四、圖解表示 SLR-TW-R2 序列之基因組成與相關位置。SLR-TW-R2 序列係葵百合 No.10 樣品經 RT-PCR 所增幅之三  
個 DNA 產物 (Tw26, P700 及 Tw-ntr3) 之核苷酸序列所合併而成。DNA 片段分別以相對長度之平行長方塊加以表示，其名稱以粗黑體字顯示於其左側。方塊上方數字表示核苷酸位置。方塊內文字表示基因種類，NTR: 非轉譯區；UPN: 未知蛋白；LCP: 大鞘蛋白；SCP: 小鞘蛋白。箭頭表示本試驗所設計之 PCR 引子方向與其在 SLR-TW-R2 序列上之相對位置。引子名稱則標示於箭頭下方。

Fig. 4. Schematic demonstration of genome organization and relative length of SLR-TW-R2 sequence. Sequence of SLR-TW-R2 was a combination of the sequence of three PCR products (i.e. Tw26, P700 and Tw-ntr3) amplified from No. 10 sample of Stargazer lily. The no. of nucleotide and its relative position in the SLR-TW-R2 sequence is shown on the top of the boxes. The identities of genes in SLR-TW-R2 are shown inside the boxes as NTR (non-translated region), UPN (unknown protein), LCP (large coat protein), and SCP (small coat protein). Arrows indicate the orientation and relative position in SLR-TW-R2 genome of the primers used in this study. The identities of the primers are given on the bottom of the arrows.

The table displays the nucleotide and deduced amino acid sequences of SLR-TW-R2. The sequence is presented in two columns, with nucleotide positions on the top and amino acid positions on the right. The amino acid sequence is written in Chinese characters. Key features include underlined start and stop codons, bold letters indicating cleavage sites, and an asterisk marking the translation stop signal.

圖五之一、SLR-TW-R2 之核苷酸及預測之複合蛋白胺基酸序列。各行右邊表示之數字乃各行核苷酸與胺基酸之次序位置。預測之蛋白解離位置乃以黑體字標示。蛋白轉譯起始碼與停止碼乃以底線方式標示。

Fig. 5-1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of SLR-TW-R2. The figures shown on the right of each line are the number of nucleotide or amino acid in the sequence. The start and termination codons for protein translation are underlined. The putative protein cleavage sites between unknown protein (UPN) and large coat protein (LCP) and between LCP and small coat protein (SCP) are indicated by bold letters. The translation stop signal is indicated by an asterisk.



圖五之二、SLR-TW-R2 之核甘酸及預測之複合蛋白胺基酸序列 (續上頁)。各行右邊表示之數字乃各行核甘酸與胺基酸之次序位置。預測之蛋白解離位置乃以黑體字標示。蛋白轉譯起始碼與停止碼乃以底線方式標示。

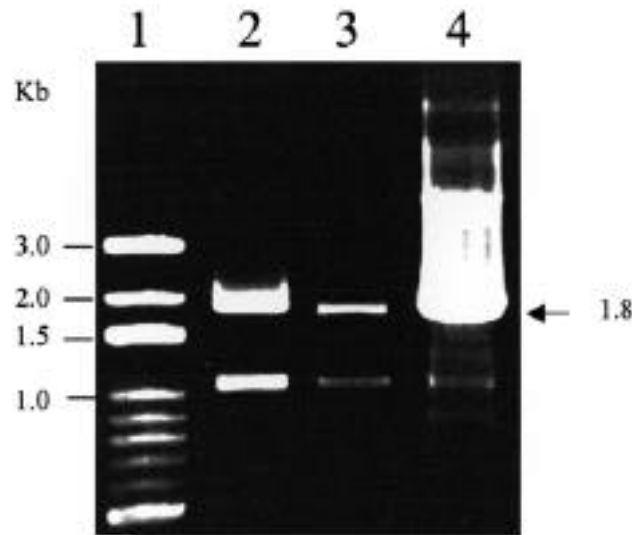
**Fig. 5-2.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of SLR-TW-R2. The figures shown on the right of each line are the number of nucleotide or amino acid in the sequence. The start and termination codons for protein translation are underlined. The putative protein cleavage sites between unknown protein (UPN) and large coat protein (LCP) and between LCP and small coat protein (SCP) are indicated by bold letters. The translation stop signal is indicated by an asterisk.

高達 96.4% 之胺基酸相同度。二者間由於在 SCP 基因之長度上有所差異，因此其 SCP 間親緣性差距較大。反觀 SLR-TW-R2 與 X75165 二者間不管在核甘酸或胺基酸序列之相同度上均高於 SLR-TW-R2 與 X77466 間之相同度，已登錄之 X75165 序列只涵蓋鞘蛋白部份而缺少 5' 端之 UNP 序列，不過其 LCP 與 SCP 之胺基酸序列與 SLR-TW-R2 間相同度高達 95.3%-98.5%，顯示這二個已知之 SLRSV

RNA2 序列中以 X75165 與 SLR-TW-R2 親緣性較高。綜合以上分析結果應足以證明 SLR-TW-R2 確實源自於 SLRSV 之一系統分離株。

**SLRSV 病毒感染百合之再確定**

為進一步確定 SLRSV 確實存在於百合組織內，我們根據分析所得之 SLRSV-TW-R2 核酸序列，設計一針對此



圖六、利用本試驗所設計之專一性引子對 (SLRSV-up1/SLRSV-dw1) 就葵百合 No.10 樣品進行 RT-PCR 分析之結果。依據 SLR-TW-R2 之序列此引子對理論上可增幅出一段約 1.8 Kb 之核酸產物。Lane 1, 標準 100 bp DNA 梯級標誌；Lane 2, 以最初由田間 No.10 樣品所抽取之 RNA 做為模版進行 PCR 反應之結果；Lane 3, 以重新再由 No.10 樣品抽取之 RNA 做為模版進行 PCR 反應之結果；Lane 4, 以 Tw55 選殖株之 DNA 做為模版進行 PCR 反應之結果。

**Fig. 6.** Result of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using a pair of primer (SLRSV-up1/SLRSV-dw1) designed for specific detection of an estimated 1.8 Kb product from *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) RNA2. Lane 1, 100 bp DNA ladder markers; Lane 2, result of RT-PCR using the same RNA template originally used in the detection of P700 sequence as in Fig. 1; Lane 3, result of RT-PCR using the RNA template re-extracted from the same No. 10 lily tissue; Lane 4, result of PCR using the cloned DNA from Tw55 as template. Besides the 1.8 Kb product, an unexpected 1.3 Kb, presumably a miss-pairing product, was also consistently detected.

<b>X75165</b>	5'-				<b>LCP</b>	<b>SCP</b>	<b>NTR</b>	- 3'
					1164nt/388aa	708nt/235aa	522nt	
						<u>84.2%</u>	<u>84.6%</u>	<u>86.1%</u>
						<u>98.5%</u>	<u>95.3%</u>	
<b>SLR-TW-R2</b>	5'-	<b>NTR</b>	<b>UPN</b>	<b>LCP</b>	<b>SCP</b>	<b>NTR</b>	- 3'	
		93nt	741nt/247aa	1164nt/388aa	708nt/235aa	517nt		
				<u>78.1%</u>	<u>78.5%</u>	<u>70.6%</u>	<u>83.8%</u>	
				<u>83.0%</u>	<u>96.4%</u>	<u>74.4%</u>		
<b>X77466</b>	5'-	<b>NTR</b>	<b>UPN</b>	<b>LCP</b>	<b>SCP</b>	<b>NTR</b>	- 3'	
		669nt	729nt/243aa	1164nt/388aa	780nt/259aa	484nt		

圖七、SLR-TW-R2 序列與已登錄於基因庫的二個草莓潛隱輪斑病毒 (SLRSV) 之 RNA2 核甘酸與胺基酸序列 (X75165 及 X77466) 間相同度比較。各序列內所含基因之核甘酸長度 (nt) 與其對應蛋白之胺基酸數目 (aa) 均分別顯示於其基因名稱下。三個核酸序列間相對基因之核甘酸與胺基酸序列相同度 (identities) 則顯示於相對位置之間，其中核甘酸相同度下方以畫線 (underlined) 方式表示之。

**Fig. 7.** Nucleotide and amino acid identities between SLR-TW-R2 and two *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) RNA2 sequences documented in Genbank. Number of nucleotide and amino acid residues of unknown protein (UPN), large coat protein (LCP), small coat protein (SCP) and non-translated region (NTR) in each sequence are indicated inside the related blocks. Percent identities of nucleotide (underlined) and amino acid are shown in the space between related genes or sequence fragments.

序列之專一性引子對 SLRSV-up1 (5'-TCCATGGGATTTGGTGGTACTG-3') 及 SLRSV-dw1 (5'-TTTCGCGATAACCCTAGGTTGG-3')，此引子對預估可由 SLRSV 之 RNA-2 中增幅出一段約 1.8 Kb 之核酸片段。經實際進行 RT-PCR 反應後發現，不管以最初由田間 No.10 樣品所抽取之 RNA 或重新自保存於甘油之葉片材料再行抽取之 RNA 作為模版，均可獲得與預估值相同之 DNA 產物 (Fig. 6)，但實驗過程中發現所設計之引子對會在預估之片段範圍內發生重複配對現象，導致 RT-PCR 結果除了預估之 1.8 Kb 產物外也會穩定出現一個約 1.1 Kb 之產物，此 1.1 Kb 產物也會發生於以純化之選殖 DNA 為模版之 PCR 結果中 (Fig. 6, Lane 4)。因此推論此 1.1 Kb 產物應屬偵測 SLRSV 之專一性結果，而非非特異性之反應。總之此項結果再度證明原有田間樣品中的確存在 SLRSV 相關之核酸序列。

## 討 論

草莓潛隱輪斑病毒 (SLRSV) 是 *Nepovirus* 病毒屬之一種<sup>(12)</sup>。最早是由 Lister 於 1964 年於蘇格蘭之草莓上所發現<sup>(14)</sup>。SLRSV 可以經由線蟲 (*Xiphinema diversicaudatum*) 媒介傳播<sup>(14)</sup>，也可以透過機械傷口及嫁接方式傳播，SLRSV 最顯著之特性是其感病作物常具有極高之種子傳播比率<sup>(14)</sup>。其寄主範圍非常寬廣，涵蓋木本果樹如梨、蘋果，瓜類蔬菜如胡瓜、甜瓜、西瓜等，豆科植物及煙草，甚至花卉如玫瑰等作物均有此病毒危害之紀錄<sup>(14)</sup>。目前曾經發現 SLRSV 之地區以高緯度溫帶國家為主，台灣過去一直沒有此病毒發生之紀錄。此次本研究在偶然之機會裡發現由荷蘭進口之部份葵百合 (cv. Stargazer) 植株中存在有此病毒之核酸訊息，經由多次之試驗均一再重複證實可由同一材料中獲得 SLRSV 相關之核酸訊息，將這些核酸訊息組合之後，獲得一全長含 3224 核甘酸之序列 SLR-TW-R2，分析顯示 SLR-TW-R2 的確與現有二種已知之 SLRSV RNA-2 序列不管在基因組成架構、核甘酸或胺基酸序列上具極高之相同度 (identities) (Fig. 7)。因此此核酸訊息應該是源自於一種與 SLRSV 親緣極為接近的病毒，而二者間之關係可能是相同之病毒或者是相同病毒之不同系統。

SLRSV 是 *Nepovirus* 屬病毒中唯一具有二個大小不等之鞘蛋白基本單位 (subunit protein) 的種類<sup>(12)</sup>，其實以此種基因組成 SLRSV 應比較接近於同屬於 Comoviridae 中的 *Comovirus* 屬，而與只有一種鞘蛋白的 *Nepovirus* 屬差別較大<sup>(12)</sup>，不過由於已知所有的 *Comovirus* 屬病毒全由甲蟲 (beetles) 所媒介傳播，而 SLRSV 藉由線蟲傳播之特性與 *Comovirus* 屬差別太大，故現今文獻上仍將 SLRSV 之分類地位定於線蟲傳播之 *Nepovirus* 屬之可能種類 (tentative species)<sup>(12)</sup>。本研究於葵百合上所分離之核酸訊息 SLR-

TW-R2，與 SLRSV 一樣具有一大一小二個基因位置相連之鞘蛋白，而且其胺基酸序列與已知的 SLRSV 鞘蛋白 (CP) 具有極高之相同度 (identity)，特別在 LCP 上與已知的二個序列相同度皆高達 96% 以上。雖然 SCP 之變異性稍大，但已登錄的二個 SLRSV 序列中 X75165<sup>(11)</sup> 與 SLR-TW-R2 胺基酸相同度亦達到 95.3%，而另一個 X77466<sup>(13)</sup> 僅有 74.4%，顯示不同來源之 SLRSV 系統間可能在 LCP 之序列上保守性較高，而在 SCP 之序列上變異性較為明顯。

目前本研究所得 SLRSV 感染葵百合之結論係依據分子生物學之證據加以判斷，然而此病毒在生物特性上是否與文獻上所稱之 SLRSV 完全符合，則仍待生物學特性之證據方能完全確定。1995 年以色列學者曾以免疫學與生物學方式證實 SLRSV 確實能夠感染葵百合<sup>(9)</sup>，本研究提出之分子生物學證據，亦顯示 SLRSV 確實存在於葵百合組織內。置於 SLRSV 對百合生產及切花品質是否有所影響，則是未來必須積極釐清之重點。以色列學者於 1995 報告 SLRSV 乃由呈現花部不對稱開展 (asymmetrical opening of flower, AF) 之葵百合植株中分離獲得<sup>(9)</sup>，但是他們並未以接種方式直接證明 SLRSV 確實可以引起 AF 病徵。在百合栽培最多的荷蘭也未見有關 SLRSV 感染百合之報告<sup>(10)</sup>，因此至今 SLRSV 在百合上之分佈情形及其經濟重要性均未有資料可詢。雖然此次本研究僅在一個葵百合材料中證明 SLRSV 之存在，但此病毒之發現仍屬國內首次之紀錄，由於是在進口之葵百合植株上發現，因此病毒極可能是來自於該批種球之生產國 - 荷蘭，此點與以色列學者之看法一致<sup>(9)</sup>，也與 SLRSV 適合分佈於高緯度地區之特性吻合。由於紀錄上 SLRSV 可以危害多種高經濟價值之木本及草本植物，因此對於進口百合可能帶有 SLRSV 之檢疫工作似有加強之必要，以避免其建立本土化族群而危及其他作物生產之可能。

## 謝 辭

本研究承台糖公司產學合作計畫 (NSC88-TSC-B-055-002) 經費補助，謹此致謝。研究過程中承蔡惠婷、謝孟娟及高靜淑小姐等技術協助深表謝意。

## 引用文獻

1. 林玖珠、張清安、陳金枝. 1999. 草莓潛隱輪斑病毒感染百合之分子生物學證據. 植物病理學會刊 8:184.
2. 張清安. 2001. 病毒病害. p.57-72. 植物保護圖鑑系列—百合保護. 行政院農委會動植物防疫檢疫局編印. 119pp.
3. 張清安、陳金枝. 2000. 百合病毒病之發生與防疫策略. p.75-85. 植物疫情與策略研討會專刊. 中華植物保護學會編印. 144 pp.



4. 張清安、陳金枝、鄧汀欽. 1998. 本省百合病毒研究及檢定技術發展現況. p.151-158. 唐蒼蒲、百合及菊花研究現況與產業發展研討會專刊 . 台中區農改場編印 . 239pp.
5. 許圳塗. 2001. 前言 p.6-12頁. 植物保護圖鑑系列—百合保護. 行政院農委會動植物防疫檢疫局編印. 台北.
6. 陳金枝、張清安、林玫珠、方懷聖. 2000. 胡瓜嵌紋病毒感染引起的港口馬兜鈴嵌紋病之鑑定. 植物病理學會刊 9:29-34.
7. Chang, C. A. 1992. Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with passionfruit woodiness virus. *Phytopathology* 82:1358-1363.
8. Chen, C. C., and Chang, C. A. 1998. Characterization of a potyvirus causing mild mosaic on tuberose. *Plant Dis.* 82:45-49.
9. Cohen, J., Gera, A., and Loebenstein, G. 1995. Strawberry latent ringspot virus in lilies. *Eur. J. Plant Pathol.* 101:217-219.
10. Derks, A. F. L. M. 1995. Lily. Pages.313-321 in: *Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops.* Loebenstein *et al.* (eds.), John Wiley & Sons, West Sussex, United Kingdom, 543 pp.
11. Everett, K. R., Milne K. S., and Forster R. L. S. 1994. Nucleotide sequence of the coat protein genes of strawberry latent ringspot virus : lack of homology to the nepovirus and comoviruses. *J. Gen. Virol.* 75 : 1821-1825.
12. Goldbach R., Martelli, G. P., and Milne, R. G. 1995. Comoviridae. p.341-347. in: *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses.* Murphy, F. A., *et al.*, eds., Springer-Verlag Wien New York. 586 pp.
13. Kreiah, S., Strunk, G., and Cooper, J. I. 1994. Sequence analysis and location of capsid proteins within RNA 2 of strawberry latent ringspot virus. *J. Gen. Virol.* 75 : 2527-2532.
14. Murant, A. F. 1974. Strawberry latent ringspot virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses.* No. 126.
15. Zerbini, F. M., Koike, S. T., and Gibertson, R. L. 1995. Biological and molecular characterization of lettuce mosaic potyvirus isolates from the Salinas Valley of California. *Phytopathology* 85: 746-752.

**ABSTRACT**

Chang, C. A.<sup>1,2</sup>, Lin, M. J.<sup>1</sup>, Chen, C. C.<sup>1</sup>, Deng, T. C.<sup>1</sup>, Liao, J. Y.<sup>1</sup> 2001. Molecular evidence for the infection of *Strawberry latent ringspot virus* in lily. *Plant Pathol. Bull.* 10:55-64. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute; <sup>2</sup> Corresponding author, Email: cachang@wufeng.tari.gov.tw; Fax:04-23331089)

*Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), a tentative species of the Genus *Nepovirus* in Comoviridae, has never been reported in Taiwan. In 1998, our laboratory detected a 0.7 kb PCR product with SLRSV-related sequence from one of the oriental lily plants (cv. Stargazer), which was grown from lily bulbs imported from the Netherland, by polymerase chain reaction. The 0.7 kb PCR product (P700) was subsequently sequenced and found that it had 90% of nucleotide identities with the 3'-terminal including part of the non-translated region of SLRSV RNA-2. To further confirm the existence of SLRSV sequence in lily, we designed a primer pair to amplify the entire coat protein gene region based on the reported RNA-2 sequence of SLRSV and obtained a PCR product (Tw26) corresponding to the estimated size of 2.7 kb. Tw26 was later cloned and sequenced and found that it comprised of 2763 base pairs encoding a single polyprotein sequence of 870 amino acid (aa) residues, which could be processed into three mature proteins, i.e. 247 aa unknown protein (UNP), 388 aa large coat protein (LCP) and 235 aa small coat protein (SCP). Downstream the polyprotein, there was a 56 nucleotide non-translated region (NTR), which was shorter than the previously known SLRSV RNA2 sequence. By combining the sequence information of P700 and Tw26, a complete 3224 bp sequence (SLR-TW-R2) with presumably full length of NTR was obtained after PCR cloning and sequencing. After analyzing in Scan DNASIS program, the nucleotide and amino acid sequences of SLR-TW-R2 were found closely resembling to two known sequences of SLRSV (X75165, X77466) from the Genbank. It had 84% and 96% of identity with the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein of X75165, respectively. On the other hand, SLR-TW-R2 showed only 70-78% of identity with the nucleotide sequence of X77466, but they shared over 96.4% of identity in the amino acid sequence of LCP. These results strongly suggest that the sequence of SLR-TW-R2 is originated from a virus identical to SLRSV or at least from a closely related strain. In 1995, the same virus was identified by immunological means in Israel to infect Stargazer lily plants imported from the Netherlands. To our knowledge, this report provided for the first time the molecular evidence showing the infection of SLRSV in lily plants.

Key words: Lily, *Strawberry latent ringspot virus*, RNA2, sequence analyses