

## 由苦瓜硬化病果上所分離之矮南瓜嵌紋病毒鞘蛋白基因之分析

黃金興<sup>1</sup> 林詩舜<sup>2</sup> 葉錫東<sup>1,3</sup>

1. 台中市 國立中興大學植物病理學系
  2. 台中市 國立中興大學農業生物科技學研究所
  3. 連絡作者，電子郵件：sdyeh@nchu.edu.tw；傳真：886-4-2877585
- 接受日期：中華民國90年1月2日

### 摘要

黃金興、林詩舜、葉錫東. 2001. 苦瓜果實硬化病之調查及其上所分離之矮南瓜嵌紋病毒鞘蛋白基因之序列分析. 植病會刊10:11-18.

苦瓜硬化果實外觀上有壞疽，烹煮不易軟化，且無食用價值。由屏東運銷到高雄市的苦瓜硬化果實，經酵素連結免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 可偵測到木瓜輪點病毒西瓜型 (PRSV W) 單獨感染，PRSV W 與矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 複合感染或 PRSV W 與胡瓜嵌紋病毒 (CMV) 複合感染。本研究由病果直接以磷酸緩衝液研磨，接種於葵藜上，經三次單斑分離後，得到純系之 ZYMV 分離株。有鑑於台灣的葫蘆科上所發生之 ZYMV 病毒病害日益嚴重，故進一步將由屏東苦瓜上分得的 TW-PT5，進行鞘蛋白核酸序列解序以進一步分析其性狀。將抽出之苦瓜病葉之總量 RNA 以 ZN1b-2 / ZCP-2 及 TNP-1 / oligo (dT)<sub>18</sub> 引子對，進行反轉錄聚合酵素連鎖反應，選殖 TW-PT5 分離株之鞘蛋白基因，其核酸及胺基酸序列與已發表之 11 個 ZYMV 分離株進行比對。顯示 TW-PT5 分離株與 4 個台灣病毒株系 (TW-CY2、TW-TC1、TW-TNML1 及 TW-TN3) 有較高的核酸相同度 (>97.7%) 與胺基酸相同度 (>98.3%)，歸屬於第一基因型。並且 TW-PT5 分離株鞘蛋白上第 73、102、109 及 149 胺基酸分別為離胺酸、絲胺酸、精胺酸及天門冬胺酸，這四個特定的胺基酸完全與第一基因型所歸納出的歸則相符合。由演化關係圖所示，TW-PT5 的演化分枝是落在第一基因型之中，與台灣分離株 (TW-NT1) 及四個美國分離株 (第二基因型)、雷悠尼島 (Reunion Island) 分離株 (第三基因型)、及新加坡分離株 (第四基因型) 有所區別，因此 TW-PT5 屬於第一基因型的台灣病毒系統。

關鍵詞：苦瓜、果實硬化、矮南瓜黃化嵌紋病毒、鞘蛋白、序列分析

### 緒言

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 屬葫蘆科 (*Cucurbitaceae*) 為一年生或多年生攀援草本，原產於亞熱帶地區。台灣一年四季皆可種植，冬季大多集中在南部栽培。目前主要產地在彰化及屏東，栽種品種以大白玉苦瓜「農友新三號」(又稱「月華」和「黑籽」) 較普遍<sup>(4)</sup>，一年總栽種面積約 900 公頃，產量約為 17000 公噸<sup>(2)</sup>。苦瓜上病蟲害很多，例如炭疽病、萎凋病、露菌病等真菌病害，根瘤線蟲、瓜實蠅、玉米穗蟲，故損失不少。隨著栽種面積增加及嫁接絲瓜枯木技術之改進，真菌病害及根瘤線蟲防治成功，而病毒所引起的果實硬化情形則愈發嚴重<sup>(5)</sup>。會感染苦瓜的病毒種類有西瓜嵌紋病毒 (*Watermelon mosaic virus*, WMV)<sup>(24)</sup>，依血清型可分為 WMV-1<sup>(6)</sup> 與 WMV-2<sup>(20)</sup>；WMV-1 日後歸為木瓜輪點病毒 W 型病毒 (*Papaya ringspot virus* W

type, PRSV W)<sup>(20)</sup>。另外尚有胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)<sup>(9)</sup>；苦瓜嵌紋病毒 (*Bittergourd mosaic virus*)<sup>(18)</sup>；矮南瓜嵌紋病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)<sup>(17)</sup>；菌質體 (mycoplasma-like organisms, MLO)<sup>(8)</sup>；及胡瓜綠斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)<sup>(1)</sup>。1987 年，許秀惠等人<sup>(3)</sup> 曾對於 1985 年秋作及 1986 年春作的苦瓜病毒病害，以間接酵素連結抗體免疫分析 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 方法進行調查，發現秋作方面，中部以 ZYMV 及 PRSV W 複合感染為主，高屏地區以 PRSV-W 為主；春作方面，高屏地區以 ZYMV 及 CMV 複合感染為主，但文章中並無病徵之描述，但已可知 ZYMV 在苦瓜栽培上為一重要限制因子。

ZYMV 為世界性病害並造成在葫蘆科上嚴重的損失，第一篇有關的報告是在 1981 年於義大利<sup>(17)</sup>，分部於歐

洲、南美洲、中東、美國及台灣等地。黃氏<sup>(12)</sup>曾將 ZYMV-7 之抗血清與台中地區不同的分離株以及美國佛羅里達 (Florida) 分離株、PRSV W、WMV-2 進行血清學上之比較，證實台灣之 ZYMV 和國外 ZYMV 並無血清上之區別。晚近 Lin<sup>(16)</sup> 等人由台灣之甜瓜、南瓜、絲瓜及小黃瓜上所分離 5 個 ZYMV 分離株，比較其彼此間鞘蛋白基因並和其他世界上已發表之 ZYMV 分離株類源比對，發現除小黃瓜上所分離到之 ZYMV 屬第二基因型，其餘分離株屬第一基因型<sup>(16)</sup>。為了瞭解台灣苦瓜上 ZYMV 與其它台灣分離株之親緣關係，本篇報告將苦瓜上所分離到之 ZYMV 分離株解析其鞘蛋白基因並與其他台灣已發表 ZYMV 鞘蛋白基因加以比較，更進一步探討台灣苦瓜上 ZYMV 病毒分離株和世界其他 ZYMV 分離株間之關係。

## 材料與方法

### 罹病材料收集與間接酵素連結抗體免疫分析

1998 年 9 月至 11 月期間內，於高雄市果菜市場上收集到產於屏東地區苦瓜硬化果實，共 44 個。所採集之罹病果實，其體積略小於健康苦瓜，並且罹病苦瓜之顏色暗淡無光澤，果實之突起顆粒表面略有壞疽現象，嚴重時，果實內層會產生褐色木栓化組織 (圖一, A)。以間接酵素結合抗體檢定法檢測。所檢測之病毒血清種類包括矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 鞘蛋白抗血清<sup>(15)</sup>、木瓜輪點病毒西瓜型 (PRSV W) 病毒抗血清<sup>(26)</sup>、胡瓜嵌紋病毒 (CMV) 鞘蛋白抗血清<sup>(13)</sup> 及西瓜銀斑病毒 (WSMV) 核鞘蛋白抗血清<sup>(29)</sup>。稱取罹病果實，加入 50 倍量 (w/v) 之附著緩衝液 (coating buffer, 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 9.6) 研磨，將研磨的粗汁液加到微量盤之孔穴中，置於 37 定溫箱反應 30 分鐘。反應完倒掉粗汁液，加入洗滌緩衝液 PBST [phosphate buffered saline, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.4] 洗滌 3 次，再加入稀釋 3000 倍之病毒鞘蛋白抗血清，置於 37 定溫箱反應 30 分鐘，反應完倒掉血清，以 PBST 洗滌 3 次後加入稀釋 5000 倍的鹼性磷酸酵素結合之山羊抗兔子抗體之免疫球蛋白 (goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Gove, Pennsylvania)，於 37 反應 30 分鐘，最後再以 PBST 洗滌 3 次，即可加入以基質緩衝液配製之鹼性磷酸酵素基質溶液呈色 10-60 分鐘，加入 3 M 氫氧化鈉 (NaOH) 停止反應，並以 ELISA 測讀儀 (Microplate Reader UV MR700, Dynatech) 在波長 405 nm 測讀吸收值。

### 病毒之單斑分離、保存及回接測定

由和 ZYMV 抗血清反應強烈之樣本，取罹病苦瓜果實 5 g，加入 10 倍量 (w/v) 的 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2)，研磨後接種於葵藜 (*Chenopodium quinoa* Wild.)，使之產生局部

病斑，經三次單斑分離，始得之純系分離株。將所分到的病毒分離株機械接種系統性寄主矮南瓜 (*Cucurbita pepo* L. var. *Zucchini*) 及苦瓜 (*Momordica charantia* L.)，觀察其病徵產生。全部測試之植物均培養於無光照控制之溫室環境，其溫度則控制在 25-30 。

### 總量 RNA 之萃取

根據 Verwoerd 等人<sup>(25)</sup> 和 Shrizadegan 等人<sup>(22)</sup> 的方法來萃取罹病矮南瓜病葉之總量 RNA。秤取病葉 0.1 g 加入液態氮磨碎後裝在離心管內，然後加 500 μl 已熱過 (80 ) 的萃取緩衝液 (extraction buffer) (0.1 M LiCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) 及 500 μl 酚 (phenol)，用手搖晃 30 秒，接著加氯仿 (chloroform)，並以桌上型離心機 (Eppendorf) 離心 10000 rpm 5 分鐘，取上層液加等體積之 4 M 氯化鋰 (LiCl)，置於 -80 ，20 分鐘後，離心 12000 rpm (Eppendorf)，10 分鐘，將沈澱物溶於 400 μl 消毒過之蒸餾水以進行第二次沈澱。加 1 / 10 倍體積之 3 M 醋酸鈉 (sodium acetate, pH 5.2) 及 2.5 倍的 100% 酒精，置於 -80 沈澱 2 小時，在高速離心 14000 rpm (Eppendorf)，15 分鐘，將沈澱物溶於消毒過之蒸餾水，再用酚 / 氯仿 (phenol/chloroform) 萃取兩次，所萃取的 RNA 利用光電比色計波長 260 nm 測定濃度。

### 反轉錄-聚合酵素連鎖反應

根據 Bateson 等人<sup>(7)</sup> 的方法加以修飾進行反轉錄-聚合酵素連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)。依據 Lin 等人<sup>(15)</sup> 之報告設計兩組引子對，ZNIb-2 / ZCP-2 及 TNP-1 / oligo (dT)<sub>18</sub> 用以進行 RT-PCR。反轉錄是由上述所萃取的總量 RNA 1 μg 加入下游引子 oligo (dT)<sub>18</sub> 於 65 3 分鐘黏合並加入反轉錄酵素 [*Avian myeloblastosis virus* (AMV) reverse transcriptase, Promega] 合成第一股 cDNA，之後分別以兩組不同的 10 pmole 的引子對，ZNIb-2 / ZCP-2 及 TNP-1 / oligo (dT)<sub>18</sub>，與 2.5 U 的聚合酵素 (Taq polymerase) 進行 PCR，增幅出兩個不同部份之 ZYMV 鞘蛋白基因片段。PCR 設定第一個循環為 94 1 分鐘變性，55 2 分鐘黏合，及 72 2 分鐘合成；其後為 94 30 秒，55 2 分鐘，及 72 2 分鐘計 33 個循環；最後一個循環為 72 5 分鐘終止反應，共反應 35 個循環。取 1 μl 之 PCR 產物進行膠體電泳分析，並以溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色，再於 UV 光照箱上檢視。

### cDNA 轉殖於載體與質體之轉型作用

以 RT-PCR 放大的 cDNA 片段經低融點瓊脂電泳染色後，於 UV 光照箱上儘快切下放大的片段，置於離心管中，65 水浴溶解 5 分鐘，以酚 (phenol) 萃取三次，氯仿 (chloroform) 萃取一次，所得上清液以 2.5 倍的 100% 酒精及

1 / 10倍的3 M醋酸钠 (sodium acetate, pH 7.0), 於 -80 沉降後, 經14000 rpm 15分鐘離心 (Eppendorf), 所得DNA沉澱物溶於10 $\mu$ l蒸餾水中。經低融點瓊脂電泳法所分得到的cDNA, 與載體 pCR-TOPO vector (TOPO TA cloning kit, Invitrogen) 進行黏合反應, 黏合完之 DNA再與 50 $\mu$ l TOP10F' 細菌於玻璃試管中混合均勻, 置於冰上30分鐘, 迅速以42 水浴加熱30秒, 之後置於冰上2分鐘, 再加125  $\mu$ l SOC培養液 (2% tryptone, 5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose) 於37 震盪培養30分鐘, 取此培養液60 $\mu$ l塗於含有50 $\mu$ g/ml安比西林 (ampicillin) 之LB平板培養基 (1% NaCl, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.5% agar) 上且此平板需先塗上100 $\mu$ l IPTG及40 $\mu$ l 2% X-gal, 將此平板置於37 , 16-17小時後, 觀察菌落的形成及顏色反應。

### DNA 序列解讀與核酸序列分析

根據 Sanger<sup>(21)</sup> 雙股去氧核糖核酸鏈終止法 (dideoxynucleotide chain termination) 的方法, 使用核酸定序組 (Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing kit, United States Biochemical)。單股DNA加入T7、ZNIb-2及 TNP-1 引子進行順向解序; T7、ZCP-2及MZCP-1引子進行反向解序。所解序之核酸序列以PC/Gene軟體6.85 版 (IntelliGenetics, INC., University of Geneva, Switzerland) 與已發表之11個ZYMV分離株進行比對, 其中五個為台灣分離株ZYMV TW-CY2 (GenBank accession number AF127930, Chiayi isolate)、ZYMV TW-TC1 (AF127931, Taichung isolate)、ZYMV TW-TNML1 (AF127933, Tainan isolate)、ZYMV TW-TN3 (AF127929, Tainan isolate)、ZYMV TW-NT1 (AF127933, Nanton isolate)<sup>(15)</sup>, 以及六個國外分離株, 分別為 ZYMV CA (L31350, California isolate)<sup>(27)</sup>、ZYMV CN (D00692, Connecticut isolate)<sup>(11)</sup>、ZYMV FL (D00593, Florida isolate)<sup>(19)</sup>、ZYMV IL (M35095, Israel isolate)<sup>(10)</sup>、ZYMV S (X62662, Singapore isolate)<sup>(14)</sup>、ZYMV RU (L29569, Reunion Island isolate)<sup>(27)</sup>。多重序列比對 (multiple sequence alignments) 是使用GCG軟體的PILEUP程式 (Version 9.0, 1996, Genetic Computer Group), 並以LINEUP程式加以編輯, 其結果以PRETTY程式計算出共同序列 (參數Plu = 2.0)。核酸與胺基酸演化距離 (evolutionary distances) 的推算, 是以GCG軟體中的Distances程式加以計算, 所使用的計算方式為 Kimura protein distance 參數。並且依據所計算出的結果以Growtree程式繪製演化關係圖。

## 結 果

### 酵素連結抗體免疫分析

應用間接ELISA偵測法, 將PRSV W、CMV、ZYMV 及WSMV的抗血清, 與苦瓜硬化果實粗汁液反應。結果發現所收集44個苦瓜硬化果實樣品中, 偵測到22個PRSV W 單獨感染, 13個PRSV W與CMV複合感染, 並且也有偵測到9個樣品為PRSV W與ZYMV複合感染, 但是並未偵測到受WSMV感染之苦瓜樣品。由於ZYMV在全世界均造成瓜類作物嚴重危害, 而且本研究之苦瓜硬化果實亦與ZYMV感染有關, 因此, 特別針對從苦瓜所分離到之ZYMV作更進一步的病徵觀察與分子層次上的遺傳分類鑑定。

### 病毒之單斑分離與回接測定

取經ELISA測定為ZYMV感染的苦瓜果實接種於白藜產生局部病斑 (圖一,B), 經三次單斑分離得一純系之ZYMV屏東分離株TW-PT5。將此TW-PT5分離株接種至矮南瓜上, 則產生葉片黃化嵌紋之病徵 (圖一,C)。將TW-PT5分離株回接到苦瓜, 約7-9天發病, 其苦瓜新葉呈簇葉狀、皺縮、變形、黃化等病徵 (圖一,D)。

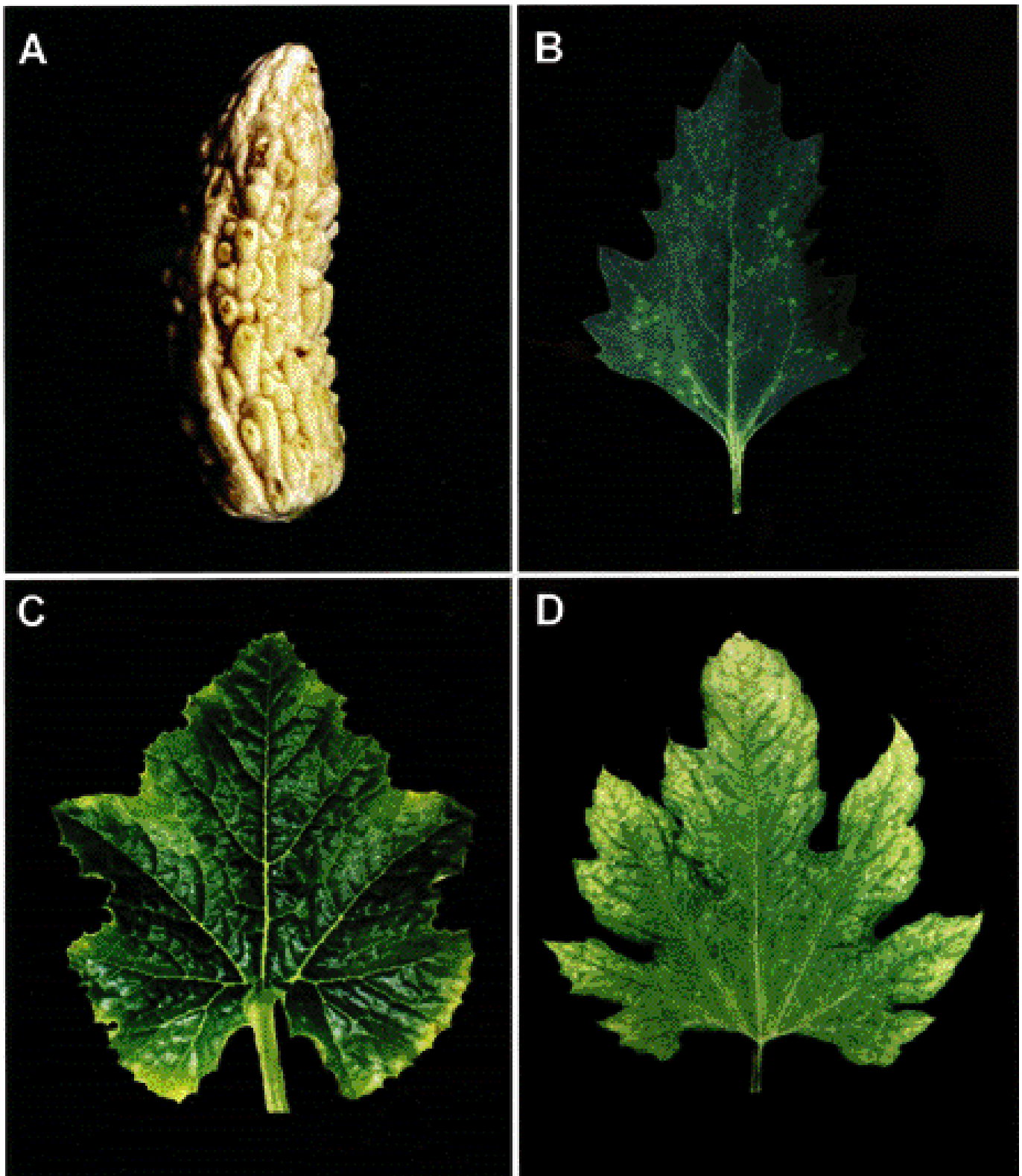
### ZYMV TW-PT5 鞘蛋白基因之選殖

ZYMV TW-PT5分離株之病毒RNA是由感病之矮南瓜病葉中萃取。所萃取之病毒 RNA以oilgo (dT)<sub>18</sub>引子 (primer) 經反轉錄作用合成第一股cDNA後, 利用ZNIb-2 / ZCP-2及TNP-1 / oligo (dT)<sub>18</sub>兩組引子對<sup>(15)</sup>, 經PCR增幅後, 分別得到兩段PCR產物 (圖二)。ZNIb-2 / ZCP-2引子對所得之片段大小為0.76 kbp, TNP-1 / oligo (dT)<sub>18</sub>引子對所得之片段大小為0.87 kbp。將上述之兩段PCR產物構築至pCR-TOPO載體, 並轉型至TOP10F' 寄主細胞中, 最後選殖出兩個選殖株 pPT1-2與pPT2-6, 其中pPT1-2是包含NIb與CP基因部分, 而pPT2-6是包含3' 端非轉譯區 (3' non-coding region) 及部分CP基因。

### ZYMV TW-PT5 鞘蛋白基因之分析

完成核酸解序的TW-PT5之pPT1-2及pPT2-6選殖株, 不包含3' 端的poly A尾端共有1105 bp, 包括部份的NIb基因56 bp, 840 bp全部鞘蛋白基因及209 bp 3' 端非轉譯區核酸。其NIb與CP蛋白切位是根據葉氏所定規則<sup>(28)</sup>, 推斷TW-PT5之NIb與CP的切位在第18個氨基酸Q與第19個氨基酸S之間, 故鞘蛋白氨基酸是從第9個氨基酸S至297個氨基酸Q為止, 共有279個胺基酸 (圖三)。

經鞘蛋白核酸與胺基酸序列之相同度比對, TW-PT5與台灣之TW-CY2、TW-TC1、TW-TNML1及TW-TN3 分離株的胺基酸相同度為 98.3-99%, 核酸相同度為 97.7-99.2% (表一); 與台灣之TW-NT1以及美國之CA、CN、FL及IL分離株胺基酸相同度為95.6-97.3%, 核酸相同度為 92.8-94.2%; 與RU分離株胺基酸相同度為 91%, 核酸相



圖一、矮南瓜黃化嵌紋病毒感染苦瓜果實、葵藜、矮南瓜與苦瓜葉片之病徵。

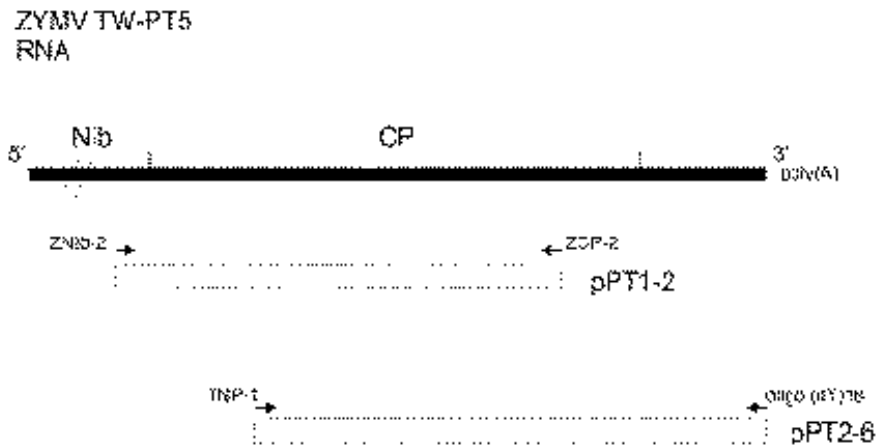
**Fig. 1.** A, fruit symptoms of bitter melon (*Momordica charantia* L.) woodiness disease., B: single lesions of ZYMV TW-PT5, isolated from a woody bitter melon originated in Pingtung, on inoculated leaves of *Chenopodium quinoa*., C: mosaic symptom on zucchini squash infected with ZYMV TW-PT5., D: leaf symptoms of bitter melon infected with ZYMV TW-PT5.

表一、由苦瓜上所分離到之矮南瓜黃化嵌紋病毒之屏東分離株 (ZYMV TW-PT5) 與其它不同地區ZYMV之鞘蛋白基因核苷酸與胺基酸之相同度

Table 1. Nucleotide and amino acid identities of the coat protein gene of ZYMV TW-PT5 collected from bitter melon from Pingtung in comparison with those of other ZYMV isolates from different geographic areas

Isolate <sup>1</sup>	Nucleotide identity (%)	Amino acid identity(%)	Genotype	Origin
TW-CY2	98.8	99	I	Chiayi, Taiwan
TW-TC1	99.2	99	I	Taichung, Taiwan
TW-TNML1	97.7	98.3	I	Tainan, Taiwan
TW-TN3	97.7	98.7	I	Tainan, Taiwan
TW-NT1	92.8	96.6	II	Nanton, Taiwan
CA	93.6	97.3	II	California
CN	93.9	97	II	Connecticut
FL	93.6	95.6	II	Florida
IL	94.2	96.6	II	Israel
RU	86.7	91.3	III	Reunion Island
S	88.9	92.6	IV	Singapore

<sup>1</sup>. The sources of the isolates and the CP sequences are: ZYMV TW-CY2 from Chiayi, Taiwan (GenBank accession number AF127930); ZYMV TW-TC1 from Taichung, Taiwan (AF127931); ZYMV TW-TNML1 from Tainan, Taiwan (AF127932); ZYMV TW-TN3 from Tainan, Taiwan (AF127929); ZYMV TW-NT1 from Nanton, Taiwan (AF127933); ZYMV CA from California, USA (L31350); ZYMV CN from Connecticut, USA (D00692); ZYMV FL from Florida, USA (D00593); ZYMV IL from Israel (M35095); ZYMV S from Singapore (X62662); and ZYMV RU from Reunion island (L29569).



圖二、選殖 ZYMV TW-PT5 分離株鞘蛋白基因之策略。

Fig. 2. The strategy for cDNA cloning and sequencing of the CP gene of ZYMV TW-PT5. Two pairs of primers, ZNIb-2 / ZCP-2 and TNP-1 / oligo (dT)<sub>18</sub>, were used to construct two cDNA clones pPT1-2 and pPT2-6 for ZYMV TW-PT5 by RT-PCR, respectively.

同度為 86.7% (表一)；與S分離株胺基酸相同度為92.6%，核酸相同度為88.9% (表一)。因此 TW-PT5與台灣分離株 (TW-CY2, TW-TC1, TW-TNML1, TW-TN3) 之胺基酸相同度最接近，同屬第一基因型 (genotype I)<sup>(16)</sup>，而與ZYMV RU之胺基酸相同度差異最大 (圖三)。

由TW-PT5之鞘蛋白胺基酸序列分析發現，鞘蛋白第73胺基酸為離胺酸 (lysine, K)，第102個胺基酸為絲胺酸 (serine, S)，第109個胺基酸為精胺酸 (arginine, R)，第149個胺基酸為天門冬胺酸 (aspartic acid, D)。這四個位置與其他11個ZYMV分離株作胺基酸序列比對，發現這四個胺

基酸與第一基因型<sup>(16)</sup>之ZYMV分離株完全相同，有別於於其它三個基因型 (圖三)。

由GCG電腦軟體預測之演化關係圖所示，TW-PT5 與 TW-CY2、TW-TC1、TW-TNML1及TW-TN3同屬於第一基因型，CA、CN、FL、IL及TW-NT1分離株為第二基因型，而RU與S分離株分別屬於第三及第四基因型 (Fig. 4)<sup>(16)</sup>。

## 討 論



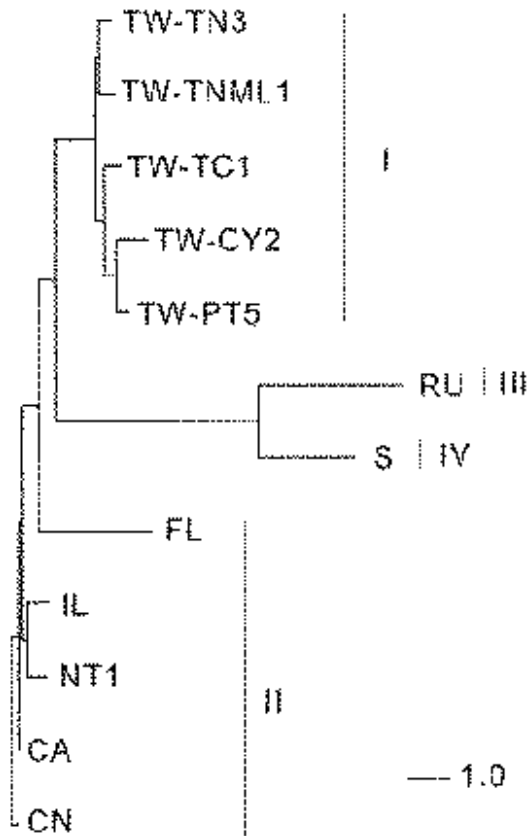
圖三、ZYMV TW-PT5 分離株與其它地區分離株之鞘蛋白胺基酸比對。  
**Fig. 3.** Alignment of the deduced amino acid sequences of the CP genes of ZYMV TW-PT5 and other reported isolates of ZYMV. "-" indicates where sequence identity occurs.

苦瓜為夏季重要蔬菜之一，由於近年來發生苦瓜果實硬化且久煮不爛現象，果實硬化嚴重者多數被農民棄置於田間，而硬化輕微者則能在市場上發現，不但農民受損，連廣大的消費民眾也蒙受其害。ZYMV 可由蚜蟲傳播，因此在春秋氣候乾燥溫和時，有翅蚜蟲繁殖旺盛，得病亦相對嚴重。由病果中直接分離得到的 ZYMV 經回接苦瓜並產生病徵後，再將發病之苦瓜葉片以 0.01 M 磷酸緩衝液研磨接種於葵藜、刺角瓜及矮南瓜後並無病徵產生，但將發病之苦瓜葉片以 ELISA 分析，結果仍有病毒之反應，推測可能是苦瓜葉片粗汁液具有抑制病毒感染之作用。劉氏 (1997) (4) 收集彰化一帶的苦瓜果實，亦分離到絲狀與球狀病毒，血清學也與 ZYMV 均有反應，此現象與此次實驗有相似之處，但文章中曾提到無法以苦瓜果實及病葉直接接種於其他寄主上，需先以低高速交替離心去除大部份植物殘渣才能用於接種，則與本實驗結論顯然不同。

所得苦瓜果實中，有發現 PRSV W 之感染，亦有

發現 PRSV W 與 ZYMV 或 CMV 複合感染。因此推測苦瓜果實硬化現象可能由複合感染所造成，而單獨感染 PRSV W 亦有可能造成苦瓜果實硬化。相對的，並未在硬化的罹病之苦瓜果實中偵測到 WSMV。我們的結果與許秀惠等人 (3) 觀察到秋作苦瓜大部分為 PRSV W 單獨感染為主之現象一致。但除了 PRSV W 與 ZYMV 複合感染外 (3)，我們亦發現 PRSV W 與 CMV 複合感染之情形，此為前人報告所無。本實驗雖然以機械接種 ZYMV 於苦瓜植株，使產生病徵，但 ZYMV 單獨或與 PRSV W 複合感染在果實硬化上病徵之探討，則必須更進一步於隔離田間網室進行觀察。

根據 Lin 等人 (16) 的歸納，凡 ZYMV 鞘蛋白基因核酸相同度高於 95% 均可列為同一基因型，因此，由核酸相同度結果推斷，TW-PT5 應為第一基因型。由演化關係圖中，亦可發現 TW-PT5 分離株是落於第一基因型之中，因此，可以肯定 TW-PT5 分離株和大部份其它台灣地區之 ZYMV 株系同屬於第一基因型。而根據 Lin 等人之報導，在台灣



圖四、矮南瓜黃化嵌紋病毒鞘蛋白基因演化關係圖。  
 Fig. 4. A phylogenetic tree compiled by GCG software showing the relationships of the CP genes of ZYMV isolates originated from Taiwan and other areas of the world. Scale of DNA distance is indicated at the lower right.

地區亦於小黃瓜上偵測到第二基因型之 ZYMV 分離株<sup>(16)</sup>，而是否可於台灣所生產之苦瓜上偵測到第二基因型的 ZYMV 分離株，則須更廣泛的偵測。由於 TW-PT5 和已知之 ZYMV 之鞘蛋白氨基酸相同度在 90% 以上，故 TW-PT5 分離株仍為同一 Potyvirus 屬，但為不同之系統 (strain)<sup>(23)</sup>。

根據 Lin 等人<sup>(16)</sup> 歸納已發表的 ZYMV 分離株之鞘蛋白氨基酸序列發現，第一基因型之 ZYMV 分離株鞘蛋白第 73、102、109 及 149 氨基酸分別為離胺酸、絲胺酸、精胺酸及天門冬胺酸。這四個位置之胺基酸為第一基因型所特有，而在 TW-PT5 分離株之鞘蛋白亦吻合此規則。因此，這個結果也更加確定 TW-PT5 為第一基因型，和已知之台灣病毒株系類源關係極為相近。此亦顯示苦瓜上之 ZYMV 極有可能係由其他瓜類作用，如甜瓜、絲瓜、胡瓜、南瓜等轉嫁而來，故在病害防治上應注意其他瓜類病園之清除，以減少被 ZYMV 感染之機會。

由於轉基因作物容易發生系統專一抗病性現象，造成只能抗某一系統，其他系統則抗病性不佳的問題。因此藉由發現更多不同 ZYMV 分離株並比對其鞘蛋白核酸序列之

差異，將有助於了解台灣病毒相之分布，進而篩選出台灣最普遍的病毒株系之鞘蛋白基因來進型基因轉殖。如此，將可以克服日後所轉殖 ZYMV 鞘蛋白基因之葫蘆科轉基因作物可能發生的系統專一抗病性問題。

The GenBank accession numbers for the sequence data reported in this paper is AF127934.

### 引用文獻

1. 王雙明、陳威紀. 1985. 胡瓜綠嵌紋病毒之扁蒲新系統. 植保會刊27:105-110.
2. 農情報導. 1998. 台灣省政府農林廳編印. 17頁.
3. 許秀惠、黃秋雄、張清安、楊偉正、張有明、蕭吉雄. 1987. 五種瓜類病毒在本省六種葫蘆科作物上之發生及分佈. 植保會刊29:233-244.
4. 劉政道、李碩朋. 1995. 果菜類-苦瓜. 399-404 頁. 臺灣農家要覽, 農作篇(二), 豐年社編著. 台北.
5. 劉秀鈴. 1997. 苦瓜果實硬化病之病原分離純化及血清學研究. 國立中興大學植物病理學研究所 第二十七屆畢業碩士論文. 56頁.
6. Adlerz, W. C. 1972. *Momordica charantia* as a source of watermelon mosaic virus 1 for cucurbit crops in Palm Beach County, Florida. Plant Dis. Rep. 56:563-564.
7. Bateson, M. F., Henderson, J., Chaleeprom, W., Gibbs, A. J., and Dale, J. L. 1994. Papaya ringspot potyvirus isolate variability and the origin of PRSV type P (Australia). J. Gen. Virol. 75:3547-3553.
8. Chou, T. G., Yang, S. J., and Huang, P. Y. 1976. Mycoplasma-like bodies observed in the plants of bottle gourd, chayote and balsam-pear with witches'-broom in Taiwan. Plant Dis. Rep. 60:378-380.
9. Dubey, G. S., and Nariani, T. K. 1975. Serological reactions of ten cucurbit virus isolates collected from Delhi. Indian Phytopathol. 28:118-119.
10. Gal-on, A., Antignus, Y., Rosner, A., and Raccach, B. 1990. Nucleotide sequence of the *Zucchini yellow mosaic virus* capsid-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. Gene. 87:273-277.
11. Grumet, R., and Fang, G. W. 1990. cDNA cloning and sequence analysis of the 3'-terminal region of *Zucchini yellow mosaic virus* RNA. J. Gen. Virol. 71: 1619-1622.
12. Huang, C. H., Hseu, S. H., and Tsai, J. H. 1989. Purification, serology and properties of five zucchini yellow mosaic virus isolates. Plant Pathol. 38:414-420.
13. Huang, Y. J. 1991. Nucleotide Sequence Analysis and Tobacco Transformation of the Coat Protein Gene of a Cucumber Mosaic Virus Infecting Tomato. M.S. thesis, Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan. 80 pp.
14. Lee, S. C., Wu, M., and Wong, S. M. 1992. Nucleotide sequence of a Singapore isolate of *Zucchini yellow*

- mosaic virus* coat protein gene revealed an altered DAG motif. *Virus Genes* 7:381-387.
15. Lin, S. S., Hou, R. F., and Yeh, S. D. 2000. Heteroduplex mobility and sequence analyses for the assessment of variability of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Phytopathology* 90:228-235.
  16. Lin, S. S., Hou, R. F., Huang, C. H., and Yeh, S. D. 1998. Characterization of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) isolates collected from different areas of Taiwan by host reactions, serology, and RT-PCR. *Plant Prot. Bull.* 40:163-177.
  17. Lisa, V., Boccardo, G., D'Agostino, G., Dellavalle, G., and D'Aquilio, M. 1981. Characterization of potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology* 71:667-672.
  18. Mathew, A. V., Mathew, J., and Mathai, G. 1991. A whitefly transmitted mosaic disease of bittergourd. *Indan Phytopathol.* 44: 497-499.
  19. Purcifull, D. E., Edwardson, J., Hiebert, E., and Gonsalves, D. 1984. Papaya Ringspot Virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Virus No 292.
  20. Quemada, H., Sieu, L. C., Siemieniak, D. R., Gonsalves, D., and Slightom, J. L. 1990. *Watermelon mosaic virus II* and *Zucchini yellow mosaic virus*: Cloning of 3'-terminal regions, nucleotide sequences, and phylogenetic comparisons. *J. Gen. Virol.* 71:1451-1460.
  21. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
  22. Shrizadegan, M., Christie, P., and Seemann, J. R. 1991. An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. *Nucl. Acids Res.* 19:6055.
  23. Shukla, D. D., and Ward, C. W. 1989. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv. Virus Res.* 36:273-314.
  24. Toba, H. H. 1962. Studies on the host range of watermelon mosaic virus in Hawaii. *Plant Dis. Rep.* 46:409-410.
  25. Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. M., and Hoekama, A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucl. Acids Res.* 17:2362.
  26. Wang, J. J., and Yeh, S. D. 1998. Characterization of the papaya ringspot virus W type isolates collected from different areas of Taiwan by host reaction, immunodiffusion tests and RT-PCR. *Plant Prot. Bull.* 40:383-395
  27. Wisler, G. C., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. 1995. Characterization of the P1 protein and coding region of the *Zucchini yellow mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* 76:37-45.
  28. Yeh, S. D. 1994. Comparison of the genetic organization of papaya ringspot virus with other potyviruses. *Plant Pathol. Bull.* 3:54-64.
  29. Yeh, S. D., Chao, C. H., Cheng, Y. H., and Chen, C. C. 1996. Serological comparison of four distinct Tospoviruses by polyclonal antibodies to purified nucleocapsid proteins. *Acta Hort.* 431:122-134.

## ABSTRACT

Huang, C.H.<sup>1</sup>, Lin, S.S.<sup>2</sup>, and Yeh, S.D.<sup>1,3</sup> 2000. Sequence analysis of the coat protein gene of *Zucchini yellow mosaic virus* isolated from diseased woody fruit of bitter gourd. *Plant Pathol. Bull.* 10:11-18. (Department of <sup>1</sup> Department of plant pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan, R.O.C., <sup>2</sup> Graduate Institute of Agricultural Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan, R.O.C., <sup>3</sup> Corresponding author, E-mail:sdye@nchu.edu.tw; Fax no. 886-4-2877585)

Diseased fruits of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) collected from southern Taiwan were found with symptoms of necrosis and woodiness. The presence of *Papaya ringspot virus* type W (PRSV W) alone, PRSV W combined with *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), or PRSV W combined with *Cucumber mosaic virus* (CMV) in the diseased fruits were detected by indirect ELISA. ZYMV TW-PT5 isolated from the fruit of bitter gourd originated from Pingtung was further characterized at the molecular level. The coat protein gene of TW-PT5 was amplified by RT-PCR with specific primers and the amplified cDNA fragments were cloned and sequenced. The CP gene of TW-PT5 was compared with those of 11 other ZYMV isolates originated from Taiwan and other areas of the world. The results revealed that the CP genes of the four Taiwan isolates share the highest nucleotide identities (>97.7%) and amino acid identities (>98.3%) with those of TW-PT5; therefore, TW-PT5 was classified with them in genotype I. Moreover, amino acid positions 73, 102, 109, and 149 of the CP of TW-PT5, where lysine, serine, arginine, and aspartic acid reside, respectively, were found identical with those of the four Taiwan isolates of genotype I. Phylogenetic analysis also indicated that TW-PT5 is grouped in genotype I with the four Taiwan isolates, but distinct from a Taiwan isolate (TW-NT1) and four US isolates (genotype II), Reunion Island isolate (genotype III), and Singapore isolate (genotype IV).

Key words: bitter gourd, woodiness, ZYMV, coat protein, sequence analysis.