

病毒病害之診斷與鑑定-以朱槿黃化嵌紋病為例

楊佳津、陳煜焜 副教授*

國立中興大學植物病理學系

*電子郵件：ykchen@nchu.edu.tw；傳真：04-2287-7585

摘要

感染朱槿(*Hibiscus rosa-sinensis* L.)的菸嵌病毒屬病毒(Genus *Tobamovirus*)近來在國外陸續被報導，分析其寄主範圍、血清反應及鞘蛋白(coat protein, CP)和移動蛋白(movement protein, MP)基因的核苷酸序列等特性，顯示感染朱槿的桿狀病毒為 *Tobamovirus* 屬的新種病毒。台灣地區也曾有朱槿受疑似菸嵌病毒感染之記錄。本研究針對感染台灣地區朱槿的菸嵌病毒之寄主範圍、血清親緣關係及鞘蛋白和移動蛋白等基因的核苷酸序列等特性進行進一步之分析。試驗結果顯示感染台灣地區朱槿的桿狀病毒與 *Tobamoviruses* 有血清類緣關係。在 CP 和 MP 的核苷酸序列及胺基酸序列上與 *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV)有高達 98% 的相似度；而與 *Hibiscus latent Fort Pierce virus* (HLFPV)則僅有 71% 的相似度。本研究之結果顯示台灣地區所分離之朱槿菸嵌病毒為 HLSV 的一個分離株。

緒言

朱槿 (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)為台灣常見之園藝作物，應用於籬笆及盆栽種植。先前研究指出造成朱槿葉片葉脈黃化及嵌紋病徵是由疑似菸嵌病毒感染所引起⁽⁶⁾，利用雙向免疫擴散法分析此病毒與菸草鑲嵌病毒(*Tobacco mosaic virus*)及齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*)無血清學之關係。

菸嵌病毒屬病毒為桿狀單股正極 RNA 病毒，長寬約 300 × 18 nm，核酸基因體長為 6.4-6.6 kb，5'端具有 cap 構造，3'端形成類似 tRNA 結構，整個病毒基因體包含四個開放轉譯架構(open reading frames, ORFs)，5'端第一個開放轉譯架構可分別轉譯出兩個蛋白產物，分子量為 125-130 kDa 及另一個通讀轉譯所產生之較大分子量 180-190 kDa 的蛋白，這兩個基因產物為病毒複製時所需之酵素。另兩個開放轉譯架構則分別轉譯出移動蛋白(movement protein, MP)及鞘蛋白(coat protein, CP)⁽¹⁵⁾。菸嵌病毒屬病毒依其基因體位置及病毒顆粒組裝起點區分為兩大群⁽¹⁰⁾，第一群病毒的包裝起點位於移動蛋白之開放轉譯架構，並可感染茄科植

物，第二群病毒的包裝起點位於鞘蛋白之開放轉譯架構，並可感染葫蘆科植物，但依據核酸序列比對及 MP 及 CP 組成的歧異度證實第三群病毒的存在，不同於前述兩群病毒，並可感染十字花科植物⁽³⁾。

近年來，已有兩個感染朱槿之菸嵌病毒於新加坡及美國加州相繼被報導，為 Hibiscus virus S (HVS)⁽²¹⁾及 Florida hibiscus virus (FHV)⁽¹⁾，之後被正式命名為 *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV) 及 *Hibiscus latent Fort Pierce virus* (HLFPV)^(2, 12, 23)，兩者的鞘蛋白核酸相同度為 68%，胺基酸相同度為 73%，是同屬於菸嵌病毒屬但不同種之病毒⁽¹⁾，此外，HLSV 及 HLFPV 與其他菸嵌病毒屬病毒之外鞘蛋白核酸相同度只有 45-53%，胺基酸相同度只有 37-57%^(1, 21)，根據此結果顯示，菸嵌病毒屬感染錦葵科植物的第四群病毒已被確立⁽¹⁾。

本研究針對在台灣地區感染朱槿的菸嵌病毒之血清親緣關係與 CP 及 MP 的序列比對進行分析，結果顯示此病毒為 HLSV 之分離株。

材料與方法

病毒來源及植物材料

採集中興大學校園內朱槿植株表現葉脈黃化及嵌紋病徵之葉片材料，罹病組織磨碎後，以粗汁液機械接種於奎藜(*Chenopodium quinoa* Willd.)葉片，產生之單斑經三次單斑分離後，接種於奎藜作為供試材料。寄主範圍之測定以奎藜病葉粗汁液機械接種於茄科、葫蘆科、十字花科及錦葵科等指示植物。

病毒純化及核酸萃取

病毒純化及核酸萃取依據 Chapman⁽⁵⁾之方法進行。罹病奎藜葉片以磷酸緩衝液(0.2 M, pH 7.2)磨碎，並以 8% PEG 6000 沉降，再利用 10-40%蔗糖梯度離心純化病毒。病毒核酸係利用酚/氯仿萃取及酒精沉降由純化之病毒顆粒中獲得。

蛋白膠體電泳分析

病毒鞘蛋白之分子量測定參考前人方法⁽¹³⁾，利用 12% SDS-PAGE 進行膠體電泳分析。

血清製備及免疫分析

血清之製備係以 0.5 mg 純化之病毒與完全佐劑充分乳化後，肌肉注射於紐西蘭白兔，一週後改以不完全佐劑與 0.5 mg 純化之病毒充分乳化後，每週注射一次，共三次，之後採血並獲得抗血清。HLSV 及 HLFPV 為 Dr. S. Adkins(USHRL-ARS-USDA, Fort Pierce, Florida, USA)及 Dr. S. M. Wong(National Singapore University, Singapore, Republic of Singapore)提供，TMV、ORSV 及

Cucumber green mottle mosaic virus(CGMMV)之血清由農試所張清安博士提供。

純化病毒經 SDS-PAGE 電泳後轉漬於硝化纖維膜，與稀釋 2000 倍之菸嵌病毒專一性血清或 IgG 反應，並以 NBT(nitroblue tetrazolium chloride)及 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphate ρ -toluidine salts)進行呈色反應⁽⁸⁾。

反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

依據已發表之 HLSV CP 及 MP 基因核酸序列(AF395898 及 AF395899)來設計引子對，CP 基因上游引子序列為 5'-CCATGCCTTACCTTAA-3'，下游引子序列為 5'-GGTTACGTTGTAGTAG-3'，預期增幅之片段大小為 492 bp，MP 基因上游引子序列為 5'-CCATGAGTCTTAATCTGGC-3'，下游引子序列為 5'-CCTTAAGGTAAGGCATCGC-3'，預期增幅之片段大小為 849 bp。以病毒核酸作為模板再加入下游引子，利用 MMLV 反轉錄酵素(Epicentre, Madison, WI, USA)合成第一股 cDNA，聚合酶連鎖反應增幅 cDNA 依下列條件進行之：首先於 94 °C 變性反應 3 分鐘，再進行 32 個循環反應，每一個循環反應為 94 °C 變性反應 50 秒，55 °C 黏合反應 50 秒，72 °C 延長聚合反應 1 分鐘，最後再於 72 °C 進行延長聚合反應 7 分鐘。PCR 反應產物以瓊脂膠體電泳法分析，經 ethidium bromide 染色，以紫外光照射判讀 DNA 條帶的大小。

鞘蛋白及移動蛋白基因之選殖及定序

將預期大小片段之 PCR 產物利用 pCR[®] 2.1-TOPO[®]載體(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)進行選殖，選殖到之轉殖株以少量質體抽取方法^(4, 20)抽取質體 DNA，再利用 automatic DNA sequencing system(ABI3730；Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)進行解序，確認選殖片段之正確性。利用 SeqWeb Version 2.02 軟體 Web-based Sequence Analysis (GCG[®] Wisconsin Package[®], Accelrys Inc. CA, USA)轉譯胺基酸序列。核酸及胺基酸序列利用 SeqWeb Version 2.02 之 BestFit 及 PileUp program 進行分析比對。

演化分析

利用 PHYLIP version 3.5c⁽⁹⁾的 Neighbor-Joining program 分析 19 種菸嵌病毒之 CP 及 MP 基因。遺傳距離利用 PRODIST program 計算而得，並利用 SEQBOOT 及 CONSENSE program 產生演化樹。

結 果

病毒及寄主範圍

以罹病朱槿組織粗汁液機械接種於奎藜及紅藜(*Chenopodium amaranticolor*)

皆產生局部感染之病斑，奎藜接種 4-5 天後接種葉片產生兩種不同型態之單斑，褪綠(chlorotic)及黃化(yellowish)，褪綠病徵初期為褪綠，之後轉為壞疽斑點；黃化病斑則仍維持黃化而不產生壞疽現象。此兩種病徵的單斑分別經過三次單斑分離，獲得朱槿病毒 chlorotic 分離株(Hibiscus virus-chlorotic isolate, HV-Ch)及朱槿病毒 yellowish 分離株(Hibiscus virus-yellowish isolate, HV-Y)。並非所有接種的植物皆會感染 HV-Ch 及 HV-Y，僅錦葵科、藜屬及菸草屬對此病毒較為感病(表一)。

本實驗中 HV-Ch 及 HV-Y 皆會系統性感染所測試之錦葵科植物，但感病程度依不同植物而有所差異，一般而言，接種葉接種 10-14 天後系統性感染的病徵相當輕微，病斑發展由深紅色到紫色。令人注意的是 HV-Ch 及 HV-Y 皆會感染菸草 *Nicotiana benthamiana*、*N. rustica* 及 *N. tabacum* 的接種葉，但不會造成系統性感染，病毒僅在菸草接種葉造成輕微嵌紋病徵，上位葉則無病徵。並利用酵素連結免疫分析(ELISA)及回接奎藜確認病毒確實感染接種葉但無感染上位葉。

SDS-PAGE 電泳及免疫轉漬分析

純化病毒經膠體電泳分析，結果顯示此病毒有一約 18 kDa 的主要條帶，較 TMV 之 CP 分子量(17.5 kDa)大。免疫轉漬分析結果指出此蛋白條帶為朱槿病毒之鞘蛋白(圖一)，HLSV、HLFPV、CGMMV 及 TMV 血清與 HV-Ch 及 HV-Y 蛋白有程度不一之血清反應，可知 HV-Ch 及 HV-Y 確為菸嵌病毒屬的一員，且這兩個分離株皆與 HLSV 和 HLFPV 血清有強烈反應。

序列分析

病毒 CP 及 MP 基因的 cDNA 經選殖後進一步解序，其 HV-Ch 及 HV-Y 的 CP 基因都有 492 個核苷酸，轉譯出 164 個胺基酸，蛋白分子量為 18.2 kDa；MP 基因有 849 個核苷酸，轉譯出 283 個胺基酸，蛋白分子量為 31 kDa。將 CP 及 MP 基因序列分別與 HLSV、HLFPV、TMV、ORSV 及 CGMMV 進行序列比對分析，HV-Ch 及 HV-Y 的 CP 與 MP 與其他非感染錦葵科之菸嵌病毒序列比對後，具有低於 65% (54.99-64.96%)及 60% (53.5-59.6%)之核酸相同度(表二)，在胺基酸層次則低於 46% (41.77-45.91%)及 32% (29.33-32.04%)之相同度(表三)。但與感染錦葵科植物之菸嵌病毒則有高於 71%的核酸及胺基酸相同度，CP 及 MP 與 HLSV 更有高達 99%之相同度，結果顯示 HV-Ch 及 HV-Y 為 HLSV 之分離株。演化樹之產生依據 17 個不同菸嵌病毒之 CP 及 MP 的胺基酸序列經程式分析後而得(圖二)。

HV-Ch 及 HV-Y 的 CP 和 MP 序列都以登載於 Genbank 資料庫，accession number 為 AY546633、AY546634、AY546635 及 AY546636。

討 論

朱槿植物感染似菸嵌病毒，呈現葉脈黃化及嵌紋病徵在台灣已發現許多年⁽⁶⁾，利用血清學方法與其他菸嵌病毒比較，指出此病毒為一新種菸嵌病毒⁽⁶⁾。在本實驗中，以生物學、血清學及分子層次分析此導致朱槿葉脈黃化嵌紋病徵的菸嵌病毒為 *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV) 的台灣分離株。

依據基因體組成及病毒顆粒組裝起點(origin of virion assembly, OAS)可將菸嵌病毒區分為兩大群⁽¹⁰⁾，第一群病毒(感染茄科植物)的 OAS 位於移動蛋白之開放轉譯架構，第二群病毒(感染葫蘆科植物)的 OAS 位於鞘蛋白之開放轉譯架構，第三群病毒(感染十字花科植物)因其核酸序列的差異及 CP 與 MP 的基因體組成差異與一、二群不同而另成一群。感染朱槿的菸嵌病毒是在亞洲及美國新發現的病毒，與其他菸嵌病毒明顯不同^(1, 2, 6, 21, 23)。HLSV⁽²¹⁾及 HV-Ch(結果未出示)的 CP ORF 上有一段(GXX)n-rich 序列，指出亞洲地區感染朱槿之菸嵌病毒為第二群菸嵌病毒的一員，但其 CP 基因與其他菸嵌病毒在核酸及胺基酸層次上只有 50% 相似度，寄主範圍也受限於錦葵科及藜科植物，所以 HLSV 及 HLFVPV 被歸類於菸嵌病毒屬感染錦葵科植物的新的一群病毒⁽¹⁾。

由於目前缺少無病毒感染的朱槿植株，尚無法進行回接試驗。一般在台灣地區田間觀察到罹病朱槿的病徵都較 HLSV 或 HLFVPV 單獨感染時明顯且嚴重，環境因素及植物植齡等因素對於病徵表現都有很大的影響，亦有可能複合感染不同分離株或其他病毒，如另一個在台灣發現可感染朱槿之病毒 *Hibiscus chlorotic ringspot virus*(HCRSV)⁽¹⁶⁾。

罹病朱槿組織粗汁液機械接種於奎藜後，產生不同型態之單斑病徵，顯示田間朱槿可能受到多種菸嵌病毒分離株的感染。目前已知 126/183 kDa 基因會破壞植物葉綠體生成，阻礙葉綠素的合成，導致葉片出現黃化嵌紋病徵，而引起壞疽病徵則與 CP 相關^(7, 11, 18, 19)，HV-Ch 及 HV-Y 的 CP 基因序列比對結果完全一樣，顯示 126/183 kDa 基因是影響單斑形成及型態的主要因子。本實驗中 HV-Ch 及 HV-Y 之全長度基因體核酸已解序完成。

以免疫轉漬法分析此朱槿菸嵌病毒與其他菸嵌病毒之血清親緣關係，TMV(第一群)及 CGMMV(第二群)血清與感染朱槿的病毒有微弱反應，而朱槿病毒之血清則與 CGMMV 病毒沒有血清反應，故菸嵌病毒屬病毒之間的血清學關係可能視其試驗方法不同而有所差異。

菸嵌病毒容易經由機械、嫁接及植物間相互接觸而傳播，而朱槿多是以扦插繁殖，因此很容易造成病毒的散佈，使用無污染的剪枝工具進行修剪或無性繁殖是防止病毒傳播的有效方法，將剪枝工具設備浸泡於 10% 氯水及 20% 脫脂奶粉中，可有效防止 HLFVPV 傳播並感染朱槿⁽¹²⁾。

引用文獻

1. Adkins, S., and Kamenova, I. 2003. Biological and molecular characterization of a novel tobamovirus with a unique host range. *Plant Dis.* 87: 1190-1196.
2. Adkins, S., Kamenova, I., Chiemsombat, P., Baker, C. A., and Lewandowski, D. J. 2004. Tobamoviruses from hibiscus in Florida and beyond. Page 8 in abstract book of the 11th International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants. Taichung, Taiwan.
3. Aguilar, I., Sanchez, F., Martin Martin, A., Martines-Herrera, D., and Ponz, F. 1996. Nucleotide sequence of *Chinese rape mosaic virus (Oilseed rape mosaic virus)*, a crucifer tobamovirus infectious on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 30: 191-197.
4. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. John Wiley & Sons.
5. Chapman, S. N. 1998. Tobamovirus isolation and RNA extraction. Pages 123-129 in: *Plant Virology Protocols, From Virus Isolation to Transgenic Resistance*. G. D. Foster and S. C. Taylor ed. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 571pp.
6. Chen, T. H., Kao, K. H., Liou, M. R., and Kao, C. L. 2001. A unique tobamovirus-like virus isolated from vein yellowing mosaic China rose (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 10: 195-200.
7. Culver, J. N., Lindbeck, A. G. C., and Dawson, W. O. 1991. Virus-host interactions: induction of chlorotic and necrotic responses in plants by Tobamoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 193-217.
8. Dijkstra, J., and de Jager, C. P. 1998. *Practical Plant Virology - Protocols and Exercises*. Springer-Verlag, Berlin. 459pp.
9. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.5c, University of Washington, Seattle, Washington, USA.
10. Fukuda, M., Meshi, T., Okada, Y., Otsuki, Y., and Takebe, I. 1981. Correlation between particle multiplicity and location on virion RNA of the assembly initiation site for viruses of the tobacco mosaic virus group. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4231-4235.
11. Holt, C. A., Hodgson, R. A. J., Coker, F. A., Beachy, R. N., and Nelson, R. S. 1990. Characterization of the masked strain of tobacco mosaic virus: identification of the region responsible for symptom attenuation by analysis of an infectious cDNA clone. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 3: 417-434.
12. Kamenova, I., and Adkins, S. 2004. Transmission, *in planta* distribution, and management of *Hibiscus latent Fort Pierce virus*, a novel tobamovirus isolated from Florida hibiscus. *Plant Dis.* 88: 674-679.

13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
14. Lartey, R. T., Voss, T. C., and Melcher, U. 1996. Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Mol. Biol. Evol.* 13: 1327-1338.
15. Lewandowski, D. J., and Dawson, W. O. 1999. Tobamoviruses. Pages 1780-1783 in: *Encyclopedia of Virology*, 2nd ed., A. Granoff and R. G. Webster ed. Academic Press, New York, 1997pp.
16. Li, S. C., and Chang, Y. C. 2002. First report of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* in Taiwan. *Plant Pathology* 51: 803.
17. Namba, K., Pattanayek, R., and Stuubs, G. 1989. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. *J. Mol. Biol.* 208: 307-325.
18. Nishiguchi, M., Kikuchi, S., Kiho, Y., Ohno, T. Meshi, T., and Okada, Y. 1985. Molecular basis of plant virus virulence: the complete nucleotide sequence of an attenuated strain of tobacco mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 13: 5585-5590.
19. Saito, T., Meshi, T., Takamatsu, N., and Okada, Y. 1987. Coat protein sequence of tobacco mosaic virus encodes host response determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6074-6077.
20. Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
21. Srinivasan, K. G., Narendrakumar, R., and Wong, S. M. 2002. *Hibiscus virus S* is a new subgroup II tobamovirus: evidence from its unique coat protein and movement protein sequences. *Arch. Virol.* 147: 1585-1598.
22. van Regenmortel, M. H. V. 1976. Antigenic relationships between strains of tobacco mosaic virus. *Virology* 71: 471-485.
23. Wong, S. M., and Srinivasan, K. G. 2004. Cloning and characterization of a new tobamovirus infecting *Hibiscus rosa-sinensis* L.. page 25 in abstract book of the 11th International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants. Taichung, Taiwan.

註: 本文摘譯自 Liu, F.L., Chen, T.C., Yeh, S.D., Hsu, H.T., Chen, C.C., Bau, H.J., and Chen, Y.K.* 2004. Serological and molecular characterizations of the hibiscus-infecting tobamovirus in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 13: 177-184.

表一、朱槿病毒(HV-Y 和 HV-Ch 分離株)之寄主範圍測定。

Table 1. Reactions of experimental plants after mechanical inoculation with hibiscus virus (strains HV-Y and HV-Ch)

Plant	Reactions*	
	Inoculated leaves	Upper leaves
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL	/
<i>C. quinoa</i>	LL	/
Malvaceae		
<i>Abelmoschus esculentus</i>	MM and DRS	MM
<i>Gossypium hirsutum</i>	MM and DRS	MM
<i>Hibiscus cannabinus</i>	MM	MM
<i>H. sabdariffa</i>	MM	MM
Solanaceae		
<i>Nicotiana benthamiana</i>	MM	/
<i>N. rustica</i>	MM	/
<i>N. tabacum</i>	MM	/

*, LL: local lesion; MM: mild mosaic; DRS: dark red spot; /: no infection.

表二、朱槿病毒 HV-Ch 及 HV-Y 分離株之鞘蛋白與移動蛋白基因與部分菸嵌病毒核酸序列之比較。

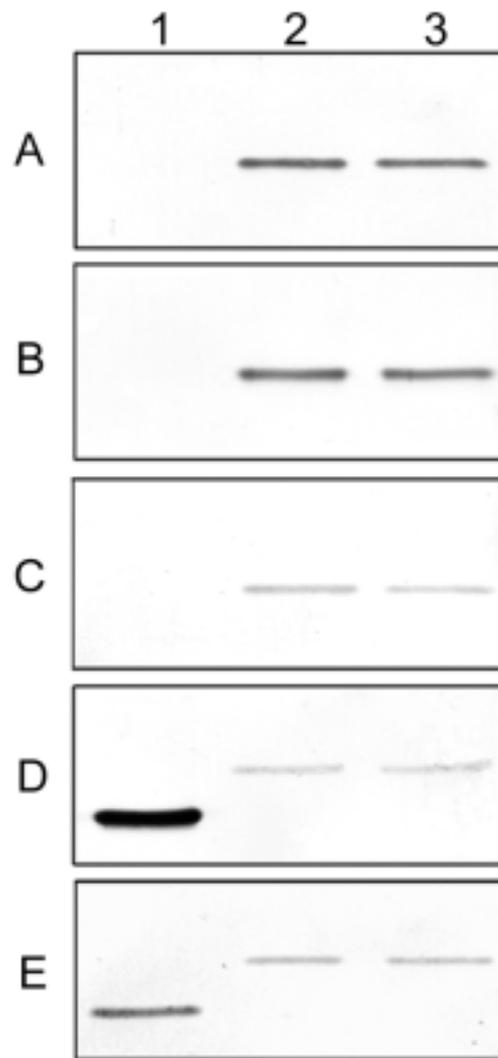
Table 2. Comparisons of homology (%) of nucleotide sequences of coat protein (CP) and movement protein (MP) genes of HV-Ch and HV-Y with some tobamoviruses

	HV-Ch		HV-Y	
	CP	MP	CP	MP
HV-Ch	-	-	100	99.76
HV-Y	100	99.76	-	-
HVS	99.39	98.94	99.39	99.18
FHV	71.82	71.26	71.82	71.69
CGMMV	54.99	53.52	54.99	53.52
TMV	61.09	57.69	61.09	57.69
ORSV	64.96	59.60	64.96	59.60

表三、朱槿病毒 HV-Ch 及 HV-Y 分離株之鞘蛋白與移動蛋白基因與部分菸嵌病毒胺基酸序列之比較。

Table 3. Comparisons of homology (%) of deduced amino acid sequences of coat protein (CP) and movement protein (MP) of HV-Ch and HV-Y with some tobamoviruses

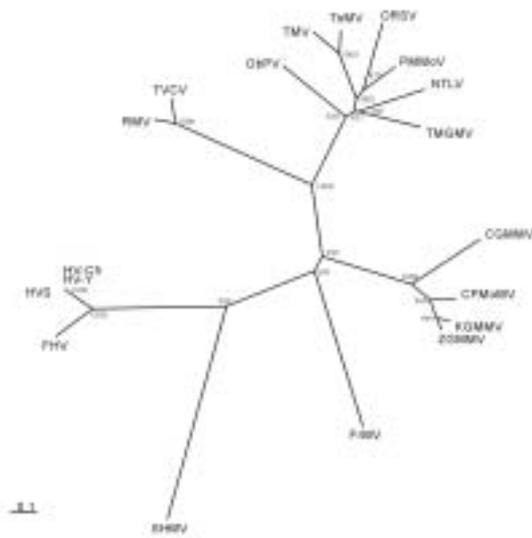
	HV-Ch		HV-Y	
	CP	MP	CP	MP
HV-Ch	-	-	100	99.29
HV-Y	100	99.29	-	-
HVS	100	98.94	100	99.65
FHV	76.92	82.97	76.92	82.97
CGMMV	45.91	31.94	45.91	31.94
TMV	41.77	31.55	41.77	32.04
ORSV	41.83	29.33	41.83	29.33



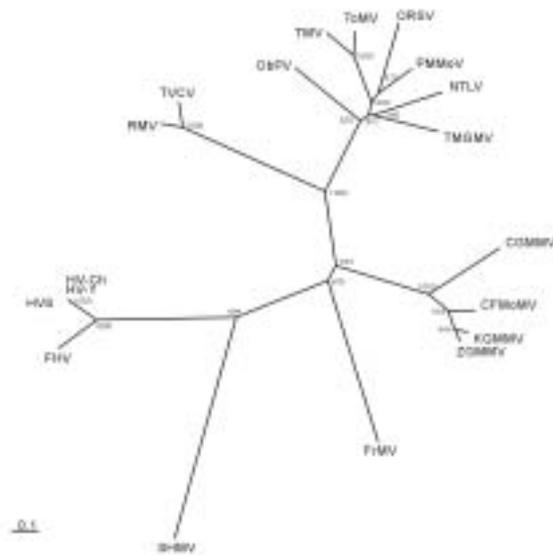
圖一、朱槿病毒與部分菸嵌病毒屬成員之鞘蛋白免疫轉漬分析。行 1,2,和 3 分別是 CGMMV, HV-Y 和 HV-Ch 病毒；列 A, B, C, D, E 分別為 HV-Y, HLSV, HLFPV, CGMMV 和 TMV 抗血清處理的轉漬膜。

Fig. 1. Immuno-blotting of purified tobamoviruses CGMMV (1), HV-Y (2), and HV-Ch (3). Viral coat proteins were probed with polyclonal antibodies of HV-Y (blot A), HLSV (blot B), HLFPV (blot C), CGMMV (blot D), and TMV (blot E).

A



B



圖二、朱槿病毒移動蛋白(A)及鞘蛋白(B)之胺基酸序列與其他菸嵌病毒屬成員比對之親緣關係樹狀圖。

Fig. 2. Phylogenetic tree based on deduced amino acid sequence comparisons of movement protein (A) and coat protein (B) showing the relationship of HV-Y and HV-Ch to other nineteen tobamoviruses. Values at the forks indicate the numbers of times out of 1000 tree that this grouping occurred after bootstrapping the data. The scale bar shows distances at substitutions per base.