

洋桔梗上胡瓜嵌紋病毒鑑定及傳播試驗¹

陳慶忠² 柯文華² 陳煜焜³

摘 要

1994年南投市田間種植之洋桔梗產生葉片黃化、嵌紋及植株矮化等徵狀。罹病葉粗汁液陰染後在電子顯微鏡下可檢視出直徑約28 nm之球形病毒顆粒。以其粗汁液機械接種15科53種植物結果12科22種受到感染，其中20種呈系統性感染，7種呈局部感染，26種為非寄主植物。新分離之病毒可感染多種瓜類作物，但不能感染菜豆及豇豆。病毒外鞘蛋白分子量與CMV之鞘蛋白同為29 kDa。血清學技術包括ELISA、雙向免疫擴散及西方漬染法等均顯示洋桔梗上之病毒與CMV-NT9有不可區分之血清類緣關係。罹病葉片組織中，病毒顆粒聚集於細胞質或液胞內，呈不規則或結晶狀積聚或者形成內含體。本病毒以蚜蟲進行傳播試驗結果，桃蚜(*Myzus persicae*)不具傳播力或傳播能力低，其原因未明。

關鍵字：洋桔梗、胡瓜嵌紋病毒、分離、鑑定、蚜蟲、傳播。

前 言

洋桔梗(*Lisianthus russellianus*, Syn. *Eustoma grandiflorum*)屬於龍膽科(Gentianaceae)的草本植物。原產於美國南部至墨西哥之間尖岩地帶。其花色因品種而異^(1,2,3)，在消費市場頗受歡迎。1968年自日本引進後在中部地區零星栽培⁽¹⁾，目前栽培地區分散在彰化縣永靖、田尾、南投市、嘉義縣新港、屏東縣竹田、萬丹等地，栽培面積約45公頃⁽⁸⁾，均採簡易設施栽培。

國外有關危害洋桔梗之病毒，經記錄者至少9種，即菜豆黃化嵌紋病毒(Bean yellow mosaic virus, BYMV, Potyvirus, 分類地位 Potyviridae)、蠶豆萎凋病毒(Broad bean wilt virus, BBWV, Fabavirus, Comoviridae)、胡瓜嵌紋病毒(Cucumber mosaic virus, CMV, Cucumovirus, Bromoviridae)、洋桔梗壞疽病毒(*Lisianthus necrotic virus*, LNV, Necrovirus)、洋桔梗條紋病毒(*Lisianthus line pattern virus*, LLPV, Ilarvirus, Bromoviridae)、菸草嵌紋病毒(Tobacco mosaic virus, TMV, Tobamovirus)、番茄嵌紋病毒(Tomato mosaic virus, ToMV, Tobamovirus)、番茄斑萎病毒(Tomato spotted wilt virus, TSWV, Tospovirus, Bunyaviridae)及洋桔梗捲葉病毒(*Lisianthus leaf curl virus*, TLCV, Geminivirus, Geminiviridae, Subgroup III)等^(12,14,18,22,23,24,25,29)，台灣已記錄之種類包括BYMV、LNV、洋桔梗輪紋病毒(*Lisianthus ring spot virus*)(暫名)及蕪菁嵌紋病毒(*Turnip mosaic virus*)^(5,6,7,9)。

¹ 台中區農業改良場研究彙報第 0476 號。

² 台中區農業改良場研究員兼作物環境課課長、技工。

³國立中興大學植物病理學系。

筆者等於1994年3月在南投市嘉禾里陳得意先生之洋桔梗園圃調查發現狀似由病毒引起之病害嚴重發生，罹病程度因花色而有差異。其中引起植株矮化、葉片黃化、嵌紋等徵狀者，初步血清學試驗顯示與胡瓜嵌紋病毒(CMV)有類緣關係。本文就洋桔梗上新分離之病毒的性質、蚜蟲傳播及血清學特性等試驗結果提出報告。

材料與方法

病毒分離與供試蚜蟲準備

1994年3月自南投市採集之黃化、嵌紋之洋桔梗病株葉片，以2倍量(W/V)磷酸緩衝液(pH 7.0，內含0.01 M Na₂SO₃)磨碎，棉花棒沾病葉粗汁液摩擦接種於撒有400目金鋼砂之奎藜(*Chenopodium quinoa*)葉片，以同法自奎藜葉採取單斑磨汁後，接種於奎藜，經三次單斑分離後，回接於萬國土菸草(*Nicotiana tabacum* cv. Vam-Hicks)，供為接種源，部份則保存於 -80 °C 備用。桃蚜(*Myzus persicae*) 於25°C 恆溫生長箱內以萬國土菸草連續飼養2-3代後，取其若蟲供為傳播試驗蟲源。

寄主範圍測定

取初發病之菸草葉片依前述方法接種莧科(Amaranthaceae)、夾竹桃科(Apocynaceae)、鳳仙花科(Balsaminaceae)、番木瓜科(Caricaceae)、石竹科(Caryophyllaceae)、藜科(Chenopodiaceae)、菊科(Compositae)、十字花科(Cruciferae)、葫蘆科(Cucubitaceae)、龍膽科(Gentianaceae)、豆科(Leguminosae)、百合科(Liliaceae)、藍雪科(Plumbaginaceae)、薔薇科(Rosaceae)及茄科(Solanaceae)等15科53種植物(表一)，於溫控室(25-28°C)內連續觀察四週，採集接种植物之葉片行ELISA分析，以確證病毒之感染。為比較CMV-NT9分離株⁽¹⁷⁾、CMV千鳥草分離株(以下簡稱CMV-Del)⁽⁴⁾及本試驗洋桔梗分離株(以下簡稱CMV-Lis)之致病性，取前述三種分離株同時機械接種於番茄等14種植物(表二)，以觀察寄主植物之差異反應。

蚜蟲傳播試驗

經飢餓處理2小時後之桃蚜若蟲，移至接種CMV-Lis發病之萬國土菸草葉片，以接種莢固罩供試蟲，餵食1小時後挑起1或5隻移至3-4葉期健康*N. tabacum* cv. Vam-Hicks及*N. benthamiana*，並以接種莢固罩蚜蟲接種24小時，挑去蚜蟲後，噴佈2.8%畢芬寧(bifenthrin)乳劑1500倍液，供試植物則移至溫控玻璃室內，每週噴藥一次，連續觀察四週。

病毒之純化

以機械接種發病之菸草新鮮病葉為材料，依Hsu *et al.* 之方法⁽¹⁷⁾略作修改進行本病毒之純化。100 g 病葉加三倍量之萃取緩衝液(0.5 M sodium citrate, 5 mM Na-EDTA, 1% thioglycolic acid, pH 6.5)磨碎，紗布過濾後，濾液以等倍量氯仿充分混合淨化，離心(Hitachi RPR 12-2, 9,500 rpm, 20分鐘)，上層液中加入2% Triton X-100攪拌20分鐘，離心(Hitachi RPR 12-2, 9,500 rpm, 20分鐘)，上層液中加入8% PEG 6000和0.2M NaCl，攪拌30分鐘，再行離心(Hitachi RPR 12-2, 9,500 rpm, 20分鐘)，以懸浮緩衝液(5mM sodium tetraborate, 0.5 mM

Na-EDTA, pH 9.0)懸浮沈澱物，再加入Triton X-100至最終濃度2%，攪拌30分鐘後離心(Hitachi RPR 20-2, 12,000 rpm, 15分鐘)，取上層液置於5 ml之20%(W/V)蔗糖溶液離心(Hitachi RP50T, 43,000 rpm, 90分鐘)，其沈澱物再以前述懸浮緩衝液懸浮。懸浮液置於10-40% 蔗糖密度梯度離心(Hitachi RPS 40T, 25,000 rpm, 2小時)，抽取病毒沈降帶，再以0.01 M磷酸緩衝液稀釋後即得純化之病毒。病毒懸浮液以 $E(0.1\%, 1\text{ cm}, 260\text{ nm})=5$ 為定量標準⁽¹³⁾。

電子顯微鏡觀察

一、陰染法

接種CMV-Lis之奎藜罹病組織粗汁液與0.1% bacitracin (1:1)混合，依Christie *et al.*⁽¹¹⁾方法以銅網吸附前述混合液，再以2% 醋酸鈾(uranyl acetate)染色。純化之病毒懸浮液經2% 甲醛(formaldehyde) 固定後，依前述方法染色，直接鏡檢(JEM-200CX, JEOL)，觀察病毒顆粒之形態，並拍照測量100顆病毒顆粒之直徑，計算病毒顆粒之平均大小。

二、超薄切片法

經機械接種發病之洋桔梗、大理花、石竹、辣椒組織，以2% 戊二醛行前固定，以1%四氧化鐵行後固定，再經酒精系列脫水和LR White樹脂滲透包埋後，以超薄切片機(Reichert ultracut S) 切取70 nm厚度的切片，經2% 醋酸鈾和檸檬酸鉛染色後以電子顯微鏡觀察病組織之病變。

病毒外鞘蛋白分子量測定

病毒外鞘蛋白分子量測定係依照Laemmli⁽²¹⁾之SDS-PAGE法行之。配製0.75×70×90 mm之非連續性電泳膠片(20 mm 之4% 積聚膠片和50 mm 之12% 解析膠片) 和電泳緩衝液，以1 ml 解離緩衝液(62.5 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8, 10% Ficoll, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 12.5 ppm bromophenol blue)，懸浮0.25 mg 病毒煮沸3分鐘後，每行注入20 μ l，電泳(constant 100 V) 1.5小時。

抗體

CMV-NT9多元抗體由國立中興大學遺傳工程中心徐堯輝博士提供⁽¹⁷⁾，CMV-Del多元抗體由本試驗室製備⁽⁴⁾。CMV-Lis多元抗體之製備係以純化自洋桔梗之病毒外鞘蛋白(29 kDa)懸浮液為抗原，經肌肉注射於紐西蘭白兔(約2 kg)，每週注射一次，連續注射四週。第一次注射之病毒懸浮液(2 mg/ml)與等量(V/V)之完全佐劑(Freund's complete adjuvant)乳化後注射，爾後三次均以不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant)乳化病毒(1 mg/ml)。第五週起進行耳朵靜脈採血。所採兔血於37°C 水浴靜置1小時，離心(Hitachi RPR 20-2, 8000 rpm, 10分鐘)後吸取血清，存於 -40°C 備用。

雙向免疫擴散反應

用PBS (15 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl) 配製0.8% 瓊脂溶液(含1% SDS)，取15 ml置於培養皿使成瓊脂平板，平板上以直徑7 mm之打孔器打洞(中

央一，周圍六)，洞距4.5 mm。洞內注入50 μ l抗原(純化之病毒，10 μ g/ μ l) 或抗血清，於室溫下進行反應。

間接酵素連結免疫分析

間接酵素連結免疫分析係依Koenig⁽²⁰⁾之方法進行，以確證供試植物被病毒感染與否。供試植物葉片以2倍量(W/V)之coating buffer (1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃, 1 L H₂O, pH 9.6) 研磨，取200 μ l 置入微量盤之孔穴中，於37 $^{\circ}$ C 靜置4小時，以PBST (8 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 2.9 g Na₂HPO₄ · 7 H₂O, 0.2 g KCl, 0.2 g NaN₃, 0.5 ml Tween-20, 1 L H₂O, pH 7.4) 洗3次，並加入200 μ l之3% bovine serum albumin (BSA) 於37 $^{\circ}$ C 反應2小時後，加入以conjugate buffer (2% PVP-40, 0.2% ovalbumin, 1 L PBST)稀釋500倍之洋桔梗CMV-Lis病毒抗血清(IgG)，37 $^{\circ}$ C 靜置2.5小時，PBST水洗3次，再加入經鹼性磷酸酵素標識且以conjugate buffer稀釋1000倍之抗體免疫球蛋白(goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma)，37 $^{\circ}$ C 靜置2.5小時或4 $^{\circ}$ C 過夜，水洗後，每穴加入200 μ l 以基質緩衝液(substrate buffer, 97 ml diethanolamine, 800 ml H₂O, 0.16 g NaN₃, pH 9.8) 配製之鹼性磷酸酵素基質(p-nitrophenyl phosphate disodium, Sigma, 1 mg/ml) 試液反應10-60分鐘，每穴加入50 μ l之3 M NaOH使反應停止，並以ELISA測讀儀(Bio-Tek Instruments, Burlington, VT, USA) 測讀在波長405 nm之吸收值。

組織轉漬法

將接種CMV-Lis之新鮮發病洋桔梗葉片除去表皮或取洋桔梗之根、莖部位，適力壓漬於硝化纖維膜(nitrocellulose membrane, nitroscreen, Dupont)，隨後浸於內含2% BSA與1% Triton 100之PBS，室溫振盪60分鐘後，浸於以PBS稀釋之CMV-Lis抗血清(1:1000)於室溫放置2小時或於4 $^{\circ}$ C 過夜。連續三次以PBS-Tween溶液清洗(PBS內含0.05% Tween 20)，每次10-15分鐘。硝化纖維膜隨之即浸於以conjugate buffer稀釋500倍之alkaline phosphatase conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG (Jackson) 室溫放置2小時，以PBST連續洗三次，每次10-15分鐘，再行顯色(40 ml substrate buffer, 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl 及5 mM MgCl₂, 加入14 mg nitroblue tetrazolium及7 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate.)10~20分鐘。

結 果

寄主範圍測定

田間自然發病之洋桔梗呈全株系統性感染。罹病株葉片明顯呈現黃化嵌紋現象(圖一A)，罹病植株矮化之程度與感染時植株大小有關。室內機械接種15科53種植物(表一)，結果20種產生系統性病徵，這些植物包括茄科之辣椒(*Capsicum annuum*)、甜椒(*Capsicum annuum*)、蔓陀蘿(*Datura stramonium*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、菸草(*N. benthamiana*), *N. tabacum* Hicks(喜國土), *N. tabacum* cv. Vam-Hicks(萬國土), *N. hybrida*, *N. rustica*, *N. tabacum* cv. White Burley)、矮牽牛(*Petunia hybrida*)、千日紅(*Gomphrena globosa*)、雞冠花(*Celosia argentea*)、大理花(*Dahlia hybrida*)、冬瓜(*Benincasa hispida*)、絲瓜(*Luffa cylindrica*)、

矮南瓜(*Cucurbita pepo* cv. field Pumpkin)、洋香瓜(*Cucumis melo*)、洋桔梗(*Lisianthus russellianus*)及紅豆(*Phaseolus angularis*)等。白莧(*Amaranthus viridis*)、三寸石竹(*Dianthus chinensis*)、紅藜(*Chenopodium amaranticolor*)、奎藜(*C. quinoa*)、金魚草(*Antirrhinum majus*)及向日葵(*Helianthus annuus*)等7種植物產生局部病斑。另26種為非寄主。CMV-Lis 汁液機械接種紅豆約12% 接種株發病，潛伏期約8天。紅豆接種株產生系統性病徵，主要呈現黃化斑點或嵌紋病徵，病葉經ELISA分析產生正反應。當接種菜豆時均無病徵產生，接種後四週之菜豆葉片行ELISA分析或行免疫擴散試驗與CMV-Lis抗血清均無免疫反應(或沈澱帶)出現。當接種豇豆時，於接種後8-10天偶會出現紫色斑點病徵(10.7%, 3/28)，產生此類病徵葉片行ELISA分析時與CMV-Lis抗血清並無免疫反應產生。

為比較CMV-NT9、CMV-Del及CMV-Lis等三個胡瓜嵌紋病毒分離株對不同寄主植物致病力的差異性，本試驗將三個分離株同時機械接種菸草、番茄、甜椒、辣椒、胡瓜、冬瓜、豇豆、紅豆、菜豆、蔓陀蘿、絲瓜及矮南瓜等植物，接種結果列如表二。三個CMV分離株接種前述植物以NT9產生之病徵最為嚴重，且接種至發病的潛伏期最短，相同供試植物對CMV-Lis之反應與接種NT9相近似，但病徵較為緩和，潛伏期亦較長。根據病徵及ELISA資料NT9及CMV-Lis不能感染豇豆及菜豆，但能感染其他12種供試植物。CMV-Del能感染菜豆及豇豆，但不能感染供試之瓜類植物，包括矮南瓜、胡瓜、絲瓜、冬瓜及哈蜜瓜。後者於接種植物出現之病徵相對較不明顯且發病潛伏期較長。

表一、胡瓜嵌紋病毒洋桔梗分離株於供試植物上之病徵

Table 1. Symptoms of *Lisianthus* isolate of cucumber mosaic virus on test plants

Test plants	Reaction *	Systemic leaves
Amaranthaceae (莧科)		
<i>Amaranthus viridis</i> (野莧)	—	
<i>A. mangostanus</i> (白莧)	LL	
<i>A. mangostanus</i> from ruber (紅莧)	—	
<i>Gomphrena globosa</i> (千日紅)	CS	+
<i>Celosia argentea</i> (雞冠花)	C,CR	+
Apocynaceae (夾竹桃科)		
<i>Vinca rosea</i> (日日春)	—	
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)	—	
Caryophyllaceae (石竹科)		
<i>Dianthus barbatus</i> (西洋石竹)	—	
<i>D. caryophyllus</i> (康乃馨)	—	
<i>D. chinensis</i> (五彩石竹)	—	
<i>D. chinensis heddewigii</i> (三寸石竹)	LL	
Chenopodiaceae (藜科)		
<i>Chenopodium amaranticolor</i> (紅藜)	LL	
<i>C. quinoa</i> (奎藜)	LL	

<i>C. serotinum</i> (小葉灰藿)	—	
Compositae (菊科)		
<i>Chrysanthemum morifolium</i> (菊花)	—	
<i>Dahlia hybrida</i> (大理花)	M	+
<i>Tagetes erecta</i> (萬壽菊)	—	
<i>Zinnia elegans</i> (百日草)	—	
<i>Helianthus annuus</i> (向日葵)	LL	
Cruciferae (十字花科)		
<i>Brassica chinensis</i> (Pak-choi) (白菜)	—	
<i>B. chinensis</i> (Ching-geeng) (青梗白菜)	—	
Cucurbitaceae (葫蘆科)		
<i>Benincasa hispida</i> (冬瓜)	C,M	+
<i>Citrullus vulgaris</i> (西瓜)	—	
<i>Cucumis melo</i> (洋香瓜)	CS	+
<i>C. metuliferus</i> (刺角瓜)	—	
<i>C. sativus</i> (胡瓜)	CS	
<i>Cucurbita pepo</i> cv. field pumpkin (矮南瓜)	CS	+
<i>Luffa cylindrica</i> (絲瓜)	CS,M	+
Gentianaceae (龍膽科)		
<i>Lisianthus russellianus</i> (洋桔梗)	LL,CS	+
Leguminosae (豆科)		
<i>Arachis hypogaea</i> (落花生)	—	
<i>Phaseolus vulgaris</i> (菜豆)	—	
<i>P. angularis</i> (紅豆)	CS,M	+
<i>Pisum sativum</i> (豌豆)	—	
<i>Vinga unguiculata</i> (豇豆)	—	
<i>V. radiata</i> (綠豆)	—	
Liliaceae (百合科)		
<i>Lilium hybrida</i> (荷蘭百合)	—	
Plumbaginaceae (藍雪科)		
<i>Limonium sinuatum</i> (星辰花)	—	
Scrophulariaceae (玄參科)		
<i>Antirrhinum majus</i> (金魚草)	LL	
Rosaceae (薔薇科)		
<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰)	—	
Solanaceae (茄科)		
<i>Capsicum annuum</i> L. red pepper (辣椒)	CR,M	+
<i>Capsicum annuum</i> L. var. grossum Seudt.(甜椒)	CS	+
<i>Datura stramonium</i> (曼陀蘿)	CS,CR	+
<i>Lycopersicum esculentum</i> (番茄)	CS,M	+
<i>Nicotiana benthamiana</i> (煙草)	CS	+
<i>N. tabacum</i> Hicks (喜國土)	CS	+
<i>N. hybrida</i> (煙草)	C	+
<i>N. rustica</i> (煙草)	C	+
<i>N. tabacum</i> cv. White Burley (煙草)	C,M	+

<i>N. tabacum</i> var. Vam-Hicks (萬國士)	M	+
<i>Petunia hybrida</i> (矮牽牛)	CS	+
<i>Solanum melongena</i> (茄子)	—	
<i>S. nigrum</i> (龍葵)	—	

* Abbreviation of symptoms : chlorosis (C) , chlorotic spot (CS), crinkle (CR), local lesion (LL), mosaic (M), no symptom (—).

表二、三種胡瓜嵌紋病毒分離株在 15 種供試植物上之病徵

Table 2. Symptoms induced by three isolates of cucumber mosaic virus (CMV) on 15 host plants

Host species	CMV isolate					
	Symptom reaction			ELISA reaction		
	CMV-Lis	CMV-D	CMV-NT9	CMV-L	CMV-D	CMV-NT9
	el		is	el	NT9	
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Vam-Hicks (萬國士)	M	CS	M	+	+	+
<i>N. tabacum</i> cv. <i>White Burley</i>	C,DG	C	C	+	+	+
<i>Capsicum annuum</i> L. (辣椒)	CR,M	M	R,M	+	+	+
<i>Capsicum annuum</i> L. (甜椒)	CS	C	C,M	+	+	+
<i>Lycopersicon esculentum</i> (番茄)	PS,C	CS	CS	+	+	+
<i>Cucurbita pepo</i> cv. Field pumpkin (矮南瓜)	CS	—	CS	+	—	+
<i>Cucumis sativus</i> (胡瓜)	CS	—	CS	—	—	—
<i>Luffa cylindrica</i> (絲瓜)	VCS,M	—	CS,M,CR	+	—	+
<i>Benincasa hispida</i> (冬瓜)	DG,CS,CR	—	DG,CS	+	—	+
<i>Cucumis melo</i> (洋香瓜)	CS	—	CS	+	—	+
<i>Phaseolus angularis</i> (紅豆)	M	—	M	+	—	+
<i>Phaseolus vulgaris</i> (菜豆)	—	C	—	—	+	—
<i>Vigna unguiculata</i> (豇豆)	PS	C	PS	—	+	—
<i>Datura stramonium</i> (曼陀蘿)	CS	CR	CR	+	+	+
<i>Eustoma russellianum</i> (洋桔梗)	C,CS	—	C,CS	+	—	+

Abbreviations of symptoms : mosaic (M), no symptom (—), chlorosis (C), crinkle (CR), darker green (DG), chlorotic spots (CS), purple spot (PS), vein with chlorotic spot (VCS).

蚜蟲傳播試驗

1997年9-12月及1998年3-4月間將取食萬國士菸草病株1小時後之桃蚜(*M. persicae*)分別以1及5隻接種*N. benthamiana*及*N. tabacum* cv. Vam-Hicks幼株。試驗結果以桃蚜接種*N. tabacum* cv. Vam-Hicks及*N. benthamiana*，不同接種蚜蟲數(1及5隻)分別接種60株，結果均無病徵產生，接種後約四週採取接種葉行ELISA分析亦均呈負反應；試驗時亦以相同病株汁液機械接種30株*N. tabacum* cv. Vam-Hicks及30株*N. benthamiana*，結果前者30株及後者29株發病，經ELISA分析均與CMV-Lis抗血清產生正反應。



圖一、洋桔梗上分離之胡瓜嵌紋病毒病徵。

- A. 田間洋桔梗之病徵 B. 機械接種菸草之病徵
C. 絲瓜機械接種不同胡瓜嵌紋病毒分離株之病徵比較

Fig. 1. Symptoms of cucumber mosaic virus isolated from *Lisianthus russellianum* (CMV-Lis).

- A. A field CMV-Lis infected *Lisianthus* plant showed chlorotic and mosaic symptoms on the leaf.
B. Mechanical inoculation of *Nicotiana tabacum* cv. White Burley with CMV-Lis resulted in the production of mosaic symptom on the leaf.
C. Symptom comparison of three different strain of CMV on *Luffa cylindrica*. Infected with CMV-Lis (1), CMV-NT9 (2,3) and CMV-Del (4).

表三、桃蚜傳播胡瓜嵌紋病毒洋桔梗株試驗

Table 3. Tests for transmission of CMV-Lis by *Myzus persicae*

Inoculum host plants	No. aphids for inoculation		Total
	1	5	
<i>N. tabacum</i> var. Vam-Hicks	0/30	0/30	0/60 *
<i>N. benthamiana</i>	0/30	0/30	0/60

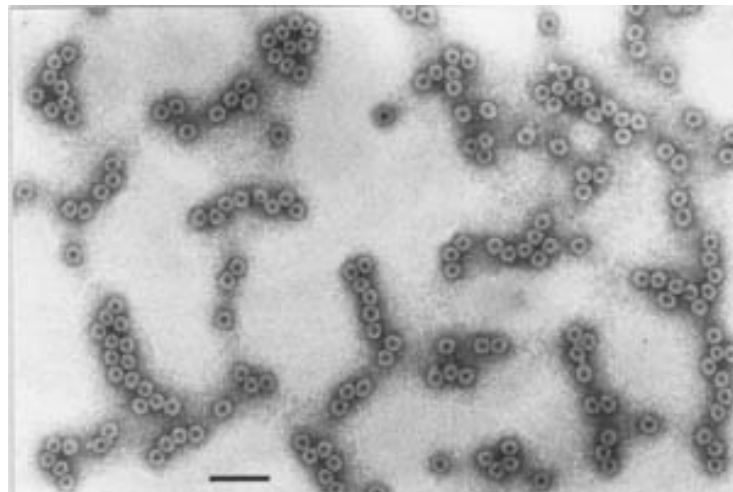
* All leaf samples symptoms with virus like symptoms or with no symptoms reacted as negative to CMV-Lis antibody by ELISA test.

病毒之純化

經10-40% 蔗糖密度梯度離心(25,000 rpm, 3 hr, Hitachi SW-28 rotor)後，在距液面約4 cm處有一明顯之病毒帶，經吸取、沈降、懸浮後稀釋50倍之懸浮液，以光電比色計掃描，分別在260 nm和240 nm出現最高和最低吸收。A260/A280的比值似與純化材料有關，若採用經 -80°C 冰凍之萬國士病葉為材料時，其比值為1.46 (N=3)，若採用未經冷凍之新鮮葉片為純化材料時，其比值為1.61 (N=3)。估計每100 g菸草冰凍及新鮮病葉之病毒收量分別為0.153 mg/g及0.198 mg/g。顯然以新鮮罹病葉片為純化材料時，純化所得病毒濃度較高。純化之病毒懸浮液機械接種洋桔梗約經8-10天出現與田間病株相類似之葉片黃化徵狀。

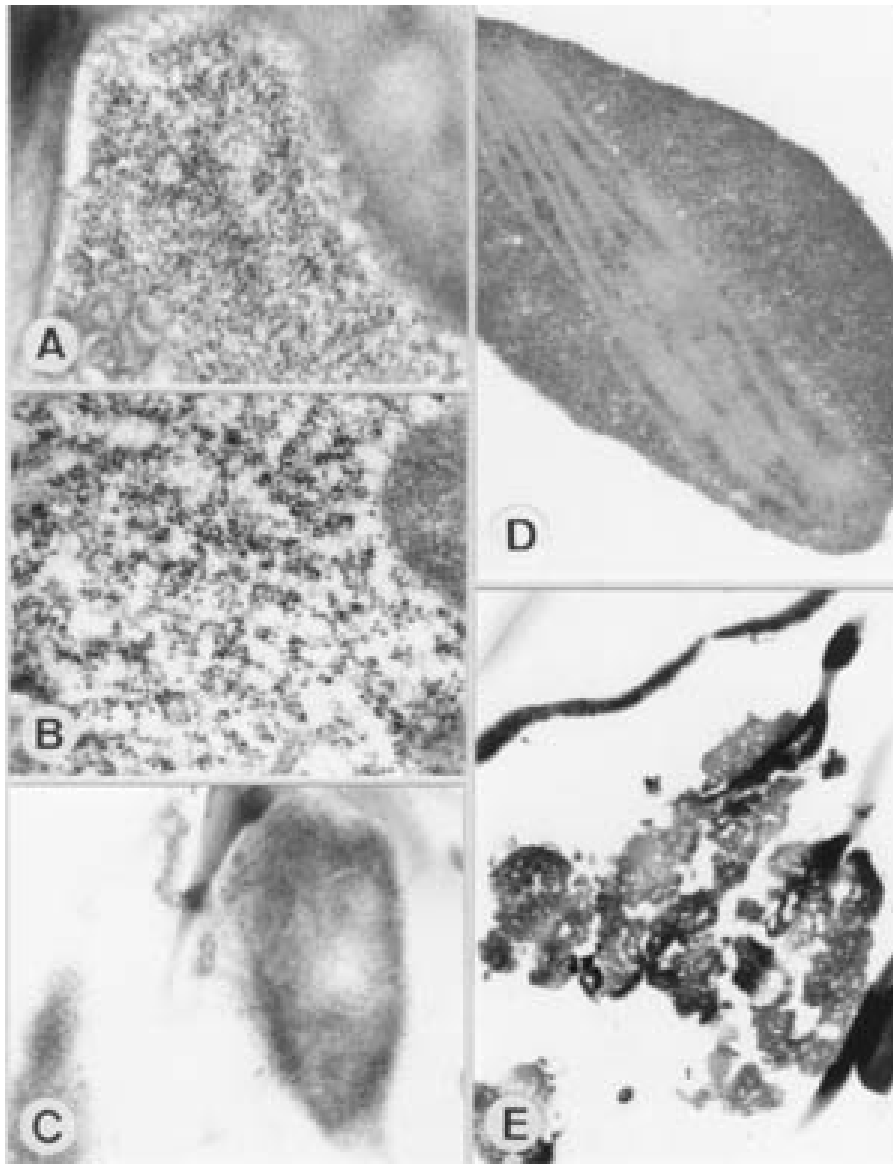
電子顯微鏡觀察

感染CMV-Lis之洋桔梗或奎藜單斑之病組織粗汁液或自罹病萬國士菸草純化之病毒懸浮液，經陰染後均可觀察到直徑約28 nm之球形病毒顆粒(圖二)，健康之洋桔梗和奎藜組織粗汁液內則無病毒顆粒存在。菸草、大理花及西洋石竹等罹病組織超薄切片中，多數切片僅見病毒顆粒呈不規則分佈於葉肉細胞之細胞質內(圖三 A,B)，有時亦發現病毒積聚而形成類似內含體(inclusion)(圖三C)。在罹病西洋石竹葉肉細胞內常見病毒顆粒分佈於細胞質內而包圍整個葉綠體，且葉綠體內之葉綠餅(grana)有明顯分解現象(圖三D)。在*N. benthamiana*罹病細胞內偶可發現病毒顆粒積聚成電子線密度深之不規則團塊存在於液胞中，超薄切片顯示病毒呈結晶狀排列(圖三E)。本試驗依據Honda and Mutsui⁽¹⁶⁾將病組織浸漬於Milloing's phosphate buffer, pH 7.0於25°C連續照光24小時再行包埋，證實此照光步驟有助於區別病毒顆粒(圖三A,B)。



圖二、自洋桔梗上純化之胡瓜嵌紋病毒形態。

Fig 2. Morphology of purified CMV particle from *Lisianthus rusellianus*. Bar=100 nm.



圖三、洋桔梗上分離之胡瓜嵌紋病毒在不同寄主細胞內之電顯圖。

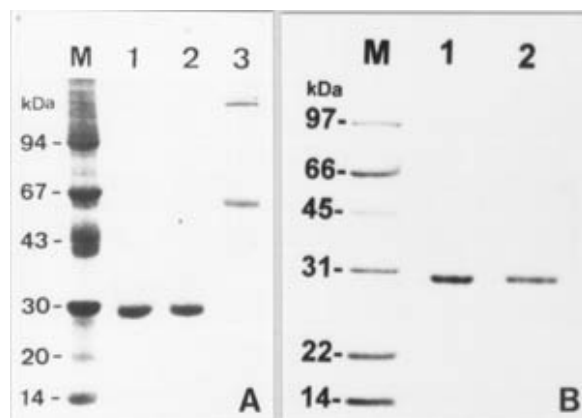
- A. 罹病煙草(*Nicotiana tabacum* cv. White Burley)葉肉組織細胞質內病毒呈不規則分佈。
- B. 罹病煙草(*N. tabacum* cv. White Burley)葉肉組織包埋固定前以磷酸緩衝液 pH 7.0 於 25°C 浸漬、照光 24 小時，細胞質內病毒顆粒明顯清晰，類似核糖體之構造消失。
- C. 罹病煙草(*N. benthamiana*)葉肉細胞內類似病毒內含體之構造。
- D. 西洋石竹病組織內似病毒內含體，細胞質內積聚病毒顆粒包埋葉綠體，葉綠餅有明顯分解現象。
- E. 煙草(*N. benthamiana*)病組織液胞內病毒呈結晶狀排列。

Fig. 3. Electron micrographs of cucumber mosaic virus isolated from *Lisianthus russellianus* (CMV-Lis) in host cells.

- A. An ultrathin section of leaf tissue of *Nicotiana tabacum* cv. White Burley infected with CMV-Lis showing the virus particles irregularly distributed in the cytoplasm.
- B. An ultrathin section of leaf tissue of *N. tabacum* cv. White Burley infected with CMV-Lis. The leaf-disks were floated on 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0 and were incubated at 25°C under continuous illumination for 24 hr prior to fixation. Virus particles in the cytoplasm were distinct and the ribosomes became amorphous.
- C. An ultrathin section of leaf tissue of *N. benthamiana* infected with CMV-Lis showing the inclusion-like structure in which virus particles are embedded.
- D. An ultrathin section of leaf tissue of *Dianthus barbatus* infected with CMV-Lis showing chloroplasts in which virus-like particles aggregated. Note the grana and lamellae were degenerated.
- E. An ultrathin section of CMV-Lis infected leaf tissue of *N. benthamiana* showing aggregation of virus-like particles into a crystal structure within vacuole.

病毒外鞘蛋白分子量

本實驗利用 Laemmli 系統之 SDS-polyacrylamide 膠體電泳⁽²⁴⁾比較分析 CMV-Lis、CMV-Del 與 CMV-NT9 之外鞘蛋白分子量，結果如圖四A,B 所示，CMV-Lis (圖四A lane 1 及圖四B lane 2)、CMV-NT9 (圖四 B lane 1) 及 CMV-Del (圖四A lane 2) 之外鞘蛋白具有幾乎相同之電泳移動位置，估算分子量均約 29 kDa。



圖四、胡瓜嵌紋病毒外鞘蛋白之 SDS-polyacrylamide 膠體電泳分析。

A. Lane M：分子量標準品；Lane 1：CMV-Lis 之外鞘蛋白(2 μ g)；Lane 2：CMV-Del 之外鞘蛋白(2 μ g)；Lane 3：健康對照。

B. Lane M：分子量標準品；Lane 1：CMV-NT9 之外鞘蛋白(1 μ g)；Lane 2：CMV-Lis 之外鞘蛋白。

Fig. 4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of virus coat proteins. Purified virions (2 μ g) of CMV-Lis (panel A and B, lane 1), CMV-Del (panel A, lane 2) lane CMV-NT9 (panel B, lane 2) and mock-inculated control (panel A, lane 3) were boiled in sample buffer as described in the Materials and Methods section, and analyzed by 12% polyacrylamide gel containing 0.15% SDS. The gels were then stained with commassie blue. The relative molecular weight of protein markers (panel A and B, lane M) were indicated on the left of lane M in panel B.

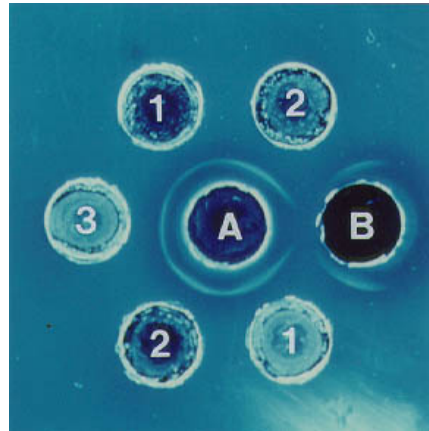
血清類緣分析

一、雙向免疫擴散反應

雙向免疫擴散反應(SDS-immunodiffusion test)顯示CMV-Lis、CMV-Del及CMV-NT9分離株與CMV-Lis、CMV-Del及CMV-NT9抗血清間均產生專一性沈澱反應，且沈澱帶交接處均呈平滑狀(圖五)，顯示三個分離株在血清學上有不可分離之類緣關係。

二、間接酵素聯結免疫分析

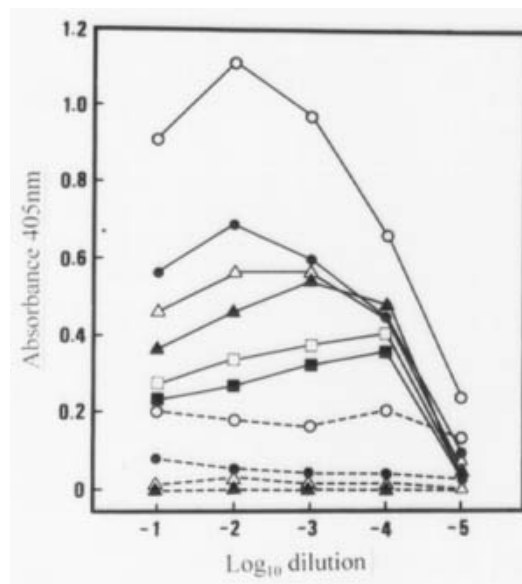
間接酵素聯結免疫分析(indirect enzyme-linked immunosorbent assays)係將CMV-Lis抗血清做系列稀釋與同源罹病葉粗汁液全抗原行免疫反應，結果顯示抗血清稀釋至8192倍時仍然有明顯之正反應產生，但當全抗原稀釋達 10^5 以上時，A405之反應值則明顯下降(圖六)。



圖五、以免疫擴散反應測定洋桔梗分離之病毒與胡瓜嵌紋病毒之類緣關係。

- A. 洋桔梗病毒抗血清 B. CMV-NT9 抗血清
 1. 洋桔梗病毒 2. CMV-NT9 分離株 3. 千鳥草分離株(CMV-Del)

Fig. 5. The serological relationships among different CMV strains as determined by immuno-double-diffusion. Purified virions of CMV-Lis (well 1), CMV-NT9 (well 2), CMV-Del (well 3) were loaded into the corresponding wells and reacted with antisera against CMV-Lis (well A) or CMV-NT9 (well B) as described in the Materials and Methods section.

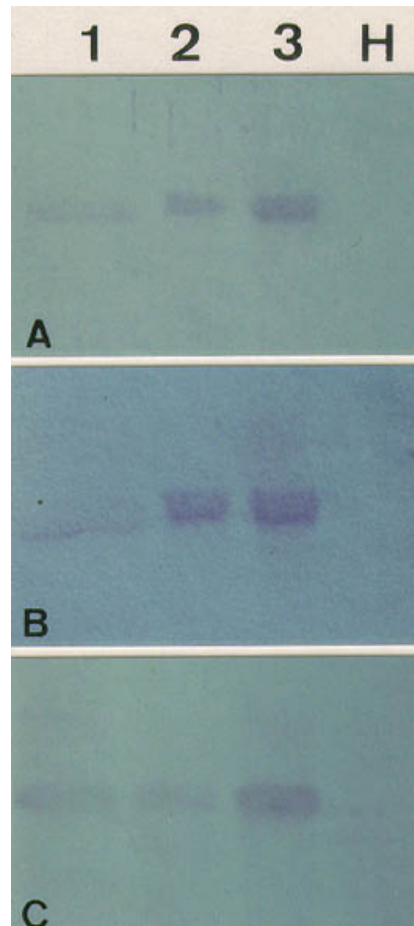


圖六、洋桔梗之胡瓜嵌紋病毒(CMV-Lis)鞘蛋白抗血清與 CMV-Lis 之間接法酵素聯結抗體免疫反應試驗。

Fig. 6. Absorbance (405nm) values for indirect enzyme-linked immunosorbent assays using the 29 kDa capsid protein antiserum of CMV-Lis. Antiserum was preabsorbed by same volume of crude sap (1:10) of healthy *N. tabacum* leaves. Dilution of antiserum $\circ = 1:256$, $\bullet = 1:512$, $\triangle = 1:1024$, $\blacktriangle = 1:2048$, $\square = 1:4096$, $\blacksquare = 1:8192$. Solid lines represent infected samples; control dotted lines represent healthy.

三、西方墨點法

利用西方墨點法(Western blotting)分析CMV-Lis、CMV-Del及CMV-NT9三個分離株間之血清類緣關係，結果顯示個別分離株之抗血清均與三個分離株之29 kDa外鞘蛋白產生專一性反應(圖七)。

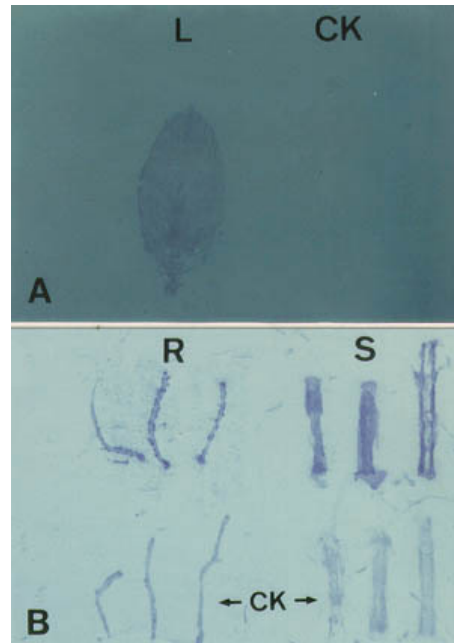


圖七、西方墨點法分析不同胡瓜嵌紋病毒分離株之血清類緣關係。

Fig. 7. Western blot analysis of coat proteins of CMV strains. Purified virions of CMV-Del (lane 1), CMV-Lis (lane 2), and CMV-NT9 (lane 3) were subjected to SDS-PAGE (12%), transferred to nitrocellulose membranes and treated with antiserum against CMV-Lis (panel A), CMV-Del (panel B), or CMV-NT9 (panel C) as described previously. Lane H contains clarified leaf extracts from mock-inoculated plants.

四、組織轉漬法

組織轉漬法(Tissue blotting)試驗結果在硝化纖維素膜(nitrocellulose membranes)上感染CMV-Lis之洋桔梗葉片、莖及根之壓出液，並經CMV-Lis多元抗體及山羊抗白兔膽鹼酵素處理後，行顯色處理均呈紫色反應，對照之健康材料則無反應(圖八)。



圖八、組織轉漬法偵測感染胡瓜嵌紋病毒之洋桔梗病組織。

Fig. 8. Immunochemical detection of CMV-Lis in tissue blots of diseased *Lisianthus rusellianus* plants.

The leaves (L, panel A), roots (R, panel B) and stems (S, panel B) from CMV-Lis infected or mock-inoculated (CK) *Lisianthus rusellianus* plants were pressed onto nitrocellulose membranes and reacted to antiserum against CMV-Lis as described previously.

討 論

本研究之目的在分離鑑定洋桔梗上之胡瓜嵌紋病毒(CMV-Lis)，同時將此病毒與本省另二個胡瓜嵌紋病毒分離株CMV-Del⁽⁴⁾及CMV-NT9⁽¹⁷⁾進行寄主植物反應性及血清類緣關係比較。血清反應試驗包括Ouchterlony gel diffusion及Western blotting等結果均顯示三者間之血清類緣關係密切。而以前述三個CMV分離株接種菸草等14種寄主植物(表二)結果，CMV-Del能感染豇豆及菜豆，但不能感染矮南瓜、胡瓜、絲瓜、冬瓜及洋香瓜等瓜類植物。而CMV-Lis及CMV-NT9可以感染前述瓜類，但不能感染菜豆及豇豆。就接種植物病徵反應而言，CMV-NT9接種至發病之潛伏期最短，病徵最為嚴重；CMV-Lis次之；而以CMV-Del之病徵最輕微，且接種至發病之潛伏期較長。就機械接種後在寄主植物之病徵言，CMV-Lis與CMV-NT9是相當近似的。

能傳播CMV之蚜蟲至少有75種，其中最常見傳播CMV者為桃蚜(*Myzus persicae*)及棉蚜(*Aphis gossypii*)⁽²⁸⁾。蚜蟲傳播CMV之效率可能受蚜蟲種類、病毒源植物、接種植物、養蚜植物及其他環境條件等之影響⁽³⁰⁾。Gera *et al.* ⁽¹⁵⁾指出*A. gossypii*傳播CMV P6系統之傳播效率極低，而傳播效率低與病毒之外鞘蛋白(coat protein)的性質有關。此外，亦有報告指出桃蚜不能傳播CMV-M strain^(10,27)。本試驗結果顯示桃蚜不能傳播CMV-Lis或傳播率極低，其原因尚待進一步探討。

文獻指出CMV在罹病植物細胞內主要分佈於細胞質、細胞核、液胞或空胞內，通常呈doughnut、不規則或結晶狀排列。其內含體在細胞質或液胞內形成，在細胞質內病毒通常積集並被一層薄膜包圍，有如球體狀構造；在液胞內則形成結晶狀構造^(16,19,26)。Honda and Mutsui⁽¹⁶⁾指出罹病菸草(*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow)黃化葉片細胞變小，細胞排列異常，細胞葉綠餅及lamellae退化，葉綠體(chloroplasts)內細胞質主要變為髓狀構造(myelin-like structure)，病毒分佈在細胞質內，少有積聚現象。細胞核之核質內亦可觀察到病毒顆粒。本試驗觀察洋桔梗CMV-Lis分離株感染之菸草，病毒顆粒通常在細胞質內呈不規則分佈，偶可發現病毒顆粒於液胞間積聚成結晶狀排列。類似內含體(inclusion)之構造或葉綠細胞之葉綠餅受到嚴重解構現象(圖二C,D)亦經常可觀察到。小型球狀病毒如CMV在超薄切片電顯觀察時，常與核糖體(ribosome)混淆，Honda and Mutsui⁽¹⁶⁾將感染CMV組織浸漬於Milloinig's phosphate buffer, pH 7.0於25°C連續照光24小時再予包埋，發現核糖體會被分解成不定形之細小顆粒，而CMV病毒則不受影響，此法俾益超薄切片時小型球狀病毒之觀察。本試驗亦比較以phosphate buffer, pH 7.0淹泡及照光處理，證明有相同之效果(圖二A,B)。

根據以上寄主範圍、血清類緣關係、病毒外鞘蛋白等試驗結果，均顯示CMV-Lis可能屬於CMV種內之分株。而CMV之種內又可區分為二個次群⁽²⁸⁾。據陳氏解讀台灣的分離株CMV-NT9及CMV-Lis的外鞘蛋白之peptide sequence homology及台灣三個胡瓜嵌紋病毒分離株(莧菜、洋桔梗、千鳥草)之CP gene的nucleotide sequence初步認為前述分離株均屬於CMV之subgroup I的病毒(陳煜焜私人通訊)。

參考文獻

- 1.成澤久 1990 高冷地洋桔梗 切花栽培技術(一、二年生草花) P 199-202 李叡明譯 淑馨出版社。
- 2.林角郎 1990 暖地洋桔梗 切花栽培技術(一、二年生草花) P 202-205 李叡明譯 淑馨出版社。
- 3.黃達雄 1995 洋桔梗 台灣農業要覽農作篇(二) P 569-574。
- 4.陳煜焜、陳慶忠、柯文華、陳脈紀 1995 千鳥草上胡瓜嵌紋病毒之分離與鑑定 植保會刊 37:319-330。
- 5.陳慶忠、陳煜焜、柯文華、陳脈紀 1995 洋桔梗壞疽病毒之分離及鑑定 植保會刊 37:445。
- 6.陳慶忠、趙佳鴻、陳煜焜 1996 本省洋桔梗輪紋病之病因探討 植保會刊 38:371。
- 7.趙佳鴻、陳慶忠、張清安 1998 感染洋桔梗之蕪菁嵌紋病毒之鑑定 植病會刊 7(4) (印刷中)
- 8.臺灣農業年報 1996、1997 台灣省政府農林廳。
- 9.Chang, C. A. and H. T. Tsai. 1993. Isolation of bean yellow mosaic virus from *Lisianthus* developing foliar mosaic and flower breaking symptoms. *Plant Path. Bull.* 2:250-251.
- 10.Chen, B. and R. I. B. Francki. 1990. Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *J. Gen. Virol.* 71:939-944.

- 11.Christie, S. R., D. E. Purcifull, W. E. Crawford and N. A. Ahmed. 1985. Electron microscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissue samples with appendices on negative staining techniques. Fla. Agr. Sta. Bull. No 872. 45pp.
- 12.Cohen, J., A. Gera, R. Ecker, R. Ben Joseph, M. Perlman, M. Gokkes, O. Lachman and Y. Antignus. 1995. Lisianthus leaf curl a new disease of Lisianthus caused by tomato yellow leaf curl virus. Plant Dis. 79:416-420.
- 13.Francki, R. I. B., D. W. Mossop and T. Hatta. 1979. Cucumber mosaic virus. No. 213. Descriptions of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surren, England.
- 14.Gera, A. and J. Cohen. 1990. The natural occurrence of bean yellow mosaic, cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in Lisianthus in Israel. Plant Pathology 39:561-564.
- 15.Gera, A. G., G. Loebenstein and B. Raccach. 1979. Protein coats of two strains of cucumber mosaic virus affect transmission by aphid gossypii. Phytopathology 69:396-399.
- 16.Honda, Y. and C. Matsui. 1968. Electron microscopy of intracellular modification of tobacco by mixed infection with cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses. Phytopathology 58:1230-
- 17.Hsu, Y. H., F. Z. Lin, C. C. Hu and S. C. Yin. 1989. Host reaction, serology and RNA pattern of cucumber mosaic virus isolates. Plant Prot. Bull. 31:51-59.
- 18.Iwaki, M., E. R. A. Maria, K. Handa, S. Onagi and R. Zenbagashi. 1985. Three viruses occurred in Lisianthus plants. Annals of the Phytopathological Society of Japan 52:355.
- 19.Kaper, J. M. and H. E. Waterworth. 1981. Cucumoviruses. In Handbook of plant virus infection and comparative diagnosis, E. Kurstak, eds, Elsevier/North-Holl and Biochemical Press. Amsterdam. P. 257-331.
- 20.Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55:53-62.
- 21.Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. Nature 227:680-685.
- 22.Lisa, V. and G. Dellavalle. 1987. Bean yellow mosaic virus in *Lisianthus russellianus*. Plant Pathology 36:214-215.
- 23.Lisa, V., A. M. Vaira, M. d' Aquilio, G. Dellavalle, V. Masenga, R. G. Milne and G. Boccardo. 1994. Characterization of an Ilarvirus from *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)*. Acta Horticulturae 377:81-89.
- 24.Lisa, V., A. M. Vaira, R. G. Milne, E. Louisom and S. Rapetti. 1990. Tomato spotted wilt virus in five crops in Liguria. Informatore Fitovirologia 40:34-41.
- 25.Mayhew, D. E. and M. E. Sorrell. 1986. A new virus disease of *Eustoma (Lisianthus)*. Phytopathology 76:1126.

26. Misawa, T. and Y. Ehara. 1965. Electron microscopic observation of host cells infected with cucumber mosaic virus. *Tohoku J. Agric. Res.* 16:159.
27. Mossop, D. W. and R. I. B. Francki. 1977. Association of RNA 3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus. *Virology* 81:171-181.
28. Paplukaitis, P., M. J. Roossinck, R. G. Dietzgen, and R. I. B. Francki. 1993. Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research* Vol. 41:281-348.
29. Provvidenti, R. 1985. Two newly recognized hosts of cucumber mosaic virus: *Eustoma grandiflorum* and *Peristrophe angustifolia*. *Plant Dis.* 69:542.
30. Quiot, J.B., G. Labonne and J. Marrou. 1982. In “ Pathogens, Vectors and Plant Disease: Approaches to control “ (K.F. Harris and K. Maramoroscd, eds.) p 95-122. Academic Press, New York.

Identification and Transmission of a Cucumovirus from *Lisianthus rusellianus*¹

Ching-Chung Chen, Wen-Fwa Ko² and Yuh-Kun Chen³

ABSTRACT

A cucumovirus which caused a severe disease on *Lisianthus rusellianus* in Nan-Tou City during the 1994 growing season was purified and characterized in this study. The infected *Lisianthus rusellianus* plants showed yellowing, mosaic, and stunting symptoms. Negative stain electron microscopy examination of the crude extract from diseased leaves revealed icosahedral virus particles about 28 nm in diameter. Mechanical infectivity assay using crude saps on 53 plant species from 15 different families showed that the virus was able to infect 27 species of 9 families, with 20 species being systemic hosts and 7 local-lesion hosts. The virus was found to infect many species in the family Cucurbitaceae, but it did not infect beans (*Phaseolus vulgaris*) nor cowpeas (*Vigna unguiculata*). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of the purified virus revealed a single coat protein with a relative molecular weight of 29 kDa, same as that found in other cucumoviruses. By ELISA, double-diffusion test, Western and tissue blot analysis, the virus is serologically indistinguishable from a well characterized cucumber mosaic virus strain, CMV-NT9. By histological studies, the virus particles were found to aggregate to form irregular or crystal accumulations or inclusion bodies in the cytoplasm or vacuoles of the infected tissues. This virus was not transmitted by *Aphis persicae*, or it was transmitted at a very low efficiency. Whether this inability of transmission was related to the composition of viral coat proteins remains to be elucidated.

Key words: *Lisianthus rusellianus*, cucumber mosaic virus, purification, characterization, aphid, transmission.

¹ Contribution No. 0476 of Taichung DAIS.

² Head of Crop Environmental Division, Technician of Taichung DAIS.

³ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University.