

# 彩色海芋黃斑病毒之分離與鑑定

陳慶忠、柯文華、葉錫東

## 目 的

2001年於彰化縣北斗鎮海芋園發現部份植株葉片產生黃化斑點，初步以indirect ELISA分析顯示新分離病毒株與 *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) 抗血清產生專一性反應；電子顯微鏡鏡檢可觀查到直徑約75~105 nm之類似tospovirus病毒顆粒。本研究探新分離病毒之各種性質並建立快速偵測技術。

## 材料與方法

(1)寄主範圍測定及回接試驗，(2)昆蟲傳播試驗，(3)電子顯微鏡觀察(陰染法及超薄切片法)，(4)血清類緣關係分析(酵素連結免疫分析法及西方轉漬法)及(5)核酸反轉錄連鎖反應(RT-PCR)。

## 結果與討論

1. 寄主範圍：室內機械接種12科36種植物，結果有5科22種發病。其中11種呈系統性感染，主要徵狀為產生黃化斑點。
2. 電子顯微鏡觀察：超薄切片罹病海芋及煙草葉片組織均可，發現大量之病毒顆粒直徑約75~100 nm分佈於細胞質內。
3. 血清反應：indirect ELISA—田間或機械接種發病之 *N. benthamiana* 葉片的粗汁液全抗原與WSMoV、TSWV、INSV及PCFV等病毒之抗血清進行indirect ELISA分析結果新病毒分離株全抗原與WSMoV核鞘蛋白兔子抗血清產生專一性反應而與其他供試Tospoviruses抗血清則無。Western blotting—田間自然罹病海芋病葉及WSMoV機械接種冬瓜發病之病葉及健康粗汁液行western blotting分析結果，WSMoV NP抗血清均可與CCRV及WSMoV核鞘蛋白產生專一性反應，但CCRV之反應明顯較弱。
4. 反轉錄聚合酶連鎖反應：為進一步釐清海芋分離株與WSMoV在分子層次上之關係，本試驗利用已發表之可鑑定 *Tospovirus* 之簡併性引子對g13637/g14435就TSWV, WSMoV, INSV及CCRV進行RT-PCR，反應結果供試病毒均可增幅出一大小約0.8 kbp而與預估值相符之核酸產物，此結果可證明確實在分子層次上與CCSV同屬 *Tospovirus*。在從WSMoV核鞘蛋白核酸序列設計之專一性引子對NPBamH1/ NPSac1與海芋分離株之RNA進行RT-PCR反應，結果確實與在田間罹染WSMoV冬瓜病葉反應相同可增幅出一約0.7 kbp與預估值相符之核酸產物，但CCSV與TSWV, INSV相似，並不能增幅出一此一核酸產物。

# 彩色海芋黃化斑點病毒之分離與鑑定

## Isolation and identification of *Calla lily chlorotic spot virus*

陳慶忠 柯文華 葉錫東

### 摘要

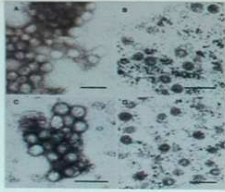
於台灣彩色海芋上分離到一種新病毒暫稱爲「海芋黃化斑點病毒 (*Calla lily chlorotic spot virus*, CCSV)」。罹病海芋植株中位葉片產生黃化斑點病徵。於罹病葉片組織汁液或超薄切片可發現直徑 75-105 nm 之類似 tospovirus 病毒顆粒。機械接種 35 種植物，其中 24 種（含冬瓜及陸留瓜）呈感病性。CCSV 可感染黃刺馬 (*Thrips palmi*) 自罹病冬瓜獲取病毒並傳播至健康冬瓜上。ELISA 及 Western blot 分析顯示 CCSV 與 *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) 具相似之血清學關係。但以 CCSV 抽取之核酸利用 WSMoV 基因專一性引子進行反轉錄 (RT-PCR) 無法產生與 WSMoV 相同之 0.7 kbp 核酸片段。以上 RT-PCR 結果顯示與已知之 tospoviruses 比較，tospovirus L-protein 相似區存在於 CCSV。

### 前言

海芋 (*Zantedeschia* spp.) 屬天南星科 (Araceae)，於 1980 年代引入台灣，主要栽培於中部地區，為目前國內夏季內、外觀切花作物之一。已紀錄感染海芋之病毒有 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)、*Turnip mosaic virus* (TuMV)、*Zantedeschia mosaic virus* (ZaMV)、*Zantedeschia mild mosaic virus* (ZaMMV)、*Konjac mosaic virus* (KaMV)、*Datsheen mosaic virus* (DsMV) 及 *Carnation mottle virus* (CaMV) 等。2001 年於彰化縣北斗鎮張姓花農海芋園發現部份植株葉片產生黃化斑點，初步以 indirect ELISA 分析顯示新分離病毒株與 *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) 血清學產生專一性反應；除拍或超薄切片罹病海芋葉片組織，於電子顯微鏡檢均可觀察到直徑約 75-105 nm 之類似 tospovirus 病毒顆粒。根據新分離病毒在彩色海芋引起之病徵特性，暫稱之為海芋黃化斑點病毒 (*Calla lily chlorotic spot virus*, CCSV)。

### 材料與方法

1. 寄主範圍測定及接種試驗：以機械接種方法接種 36 種植物，觀察記錄病徵及潛伏期，並將新分離病毒株回接海芋幼株。
2. 昆蟲傳播試驗：以室內飼養之 1 齡黃刺馬幼虫吸食罹病 WSMoV 之冬瓜葉片，再將吸食植株之前馬接種吸食健康冬瓜苗，接種植株置於溫室觀察病徵，再以 ELISA 分析之。
3. 電子顯微鏡觀察：以除拍法及超薄切片法準備標本，給色後以電子顯微鏡觀察組織之病變情形。
4. 血清學關係分析：以間接酵素連結免疫分析法 (Indirect ELISA) 及西方轉漬法 (Western blotting) 分析 CCSV 之血清學關係。
5. 核酸反轉錄連鎖反應 (RT-PCR)：以專一性引子對 (degenerate primers) 利用反轉錄 PCR 試劑盒進行 RT-PCR 反應。

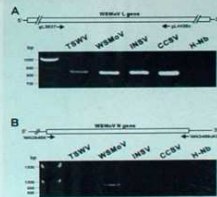


彩色海芋黃化斑點病毒顆粒之電顯圖

海芋罹病葉汁液以 2% 醋酸鉍陰染之病毒顆粒 (A) 及超薄切片之病毒顆粒 (B) 電顯圖。菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 罹病葉汁液以 2% 醋酸鉍陰染之病毒顆粒 (C) 及超薄切片之病毒顆粒 (D) 電顯圖。

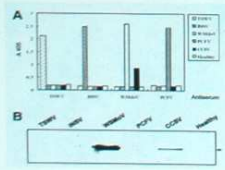


彩色海芋黃化斑點病毒於彩色海芋葉片引起之病徵 (A) 葉上表面之病徵 (B) 葉下表面之病徵 (C) 彩色海芋幼株接種產生黃化斑(箭頭)。



反轉錄聚合鏈鎖反應 (RT-PCR)

以 *Tospovirus* 之 L RNA 專一性引子對 (A) 及 WSMoV N-gene 專一性引子對 (B) 與 TSWV、INSV、WSMoV 及 CCSV 核酸進行反轉錄聚合鏈鎖反應。



彩色海芋黃化斑點病毒血清學連結免疫分析 (A) 及免疫轉漬分析 (B)。(A) 以 TSWV、INSV、WSMoV 及 PCFV 抗血清對 TSWV、INSV、WSMoV、PCFV 及 CCSV 抗原進行間接免疫連結免疫分析。(B) TSWV、INSV、WSMoV、PCFV 及 CCSV 抗原以 WSMoV 抗血清進行免疫轉漬分析。

```

1
TSWV .....
WSMoV .....
CCSV .....
INSV .....
TFPV .....
TSWV .....
TSWV .....
Consensus TRNAGTFIRN TRNAGAGG SRALISQY KIKKALAY STINWPTAL QEN SCDA FRANDQNS AGAL TVETI LAVINDVLT TNRSLACG
200
TSWV .....
WSMoV .....
CCSV .....
INSV .....
TFPV .....
TSWV .....
TSWV .....
Consensus TRNAGTFIRN TRNAGAGG SRALISQY KIKKALAY STINWPTAL QEN SCDA FRANDQNS AGAL TVETI LAVINDVLT TNRSLACG
300
TSWV .....
WSMoV .....
CCSV .....
INSV .....
TFPV .....
TSWV .....
TSWV .....
Consensus TRNAGTFIRN TRNAGAGG SRALISQY KIKKALAY STINWPTAL QEN SCDA FRANDQNS AGAL TVETI LAVINDVLT TNRSLACG
400

```

彩色海芋黃化斑點病毒與國內外已發表 5 個 tospoviruses 部份 L-gene 之胺基酸序列分析