

萵苣嵌紋病毒之多元抗血清製作與應用

曹麗玉^{1,*} 林照能²

摘要

曹麗玉、林照能。2015。萵苣嵌紋病毒之多元抗血清製作與應用。台灣農業研究 64(2):159–166。

引起嵌紋、皺葉病徵的萵苣樣品接種至紅藜、白藜等病毒指示植物，經過生物分析、寄主範圍測試、病斑特性觀察及血清學等證據顯示，病因為萵苣嵌紋病毒 (*Lettuce mosaic virus*; LMV)。以人工方式接種單斑系病毒於 7 科 27 種植物，其中萵苣、菠菜、豌豆及圓葉菸草均產生系統性嵌紋病徵，奎藜表現系統性黃化斑點病徵，紅藜及千日紅則出現局部壞疽斑點病徵，其餘供試植株均未出現病徵。利用聚丙烯醯胺膠體電泳分離出病毒鞘蛋白 (35 KDa) 作為免疫源，注射白兔製作 LMV 抗血清。以間接酵素連結免疫抗體吸附分析法 (indirect-ELISA) 進行血清最適稀釋濃度評估，抗血清稀釋濃度可達 5,000 倍，以此濃度偵測罹病植株粗汁液，病葉汁液稀釋倍數靈敏度可達 1/640 倍。檢測市售 10 批商業品種萵苣種子及 7 批種苗，LMV 檢出率分別介於 0–28% 及 0–13.3%。調查雲林縣麥寮鄉的結球萵苣產區，隨機檢測疑似罹病萵苣 113 株，LMV 病毒檢出率達 37%。

關鍵詞：萵苣、萵苣嵌紋病毒、血清、檢測。

前言

萵苣 (*Lactuca sativa* L.) 屬菊科 (Compositae) 作物，為重要的蔬菜種類之一，台灣近年來隨著消費型態改變，萵苣在生菜中佔有重要地位，消費量逐年增加。根據 2013 年農糧署農業統計年報資料顯示，全台萵苣種植面積達 2,986 ha，年產量約 54,334 Mg，主要產區以雲林縣 (二崙、崙背、西螺及麥寮) 為主，新北市與桃園縣次之。可危害萵苣的病毒種類至少有 15 種以上 (Davis *et al.* 2003)，其中又以萵苣嵌紋病毒 (*Lettuce mosaic virus*; LMV) 為萵苣生產限制因子之一 (Dianant & Lot 1992; Krause-Sakate *et al.* 2002; Davis *et al.* 2003; German-Retana *et al.* 2008; Soleimani *et al.* 2011)。萵苣嵌紋病毒屬於馬鈴薯 Y 病毒屬 Potyvirus (King *et al.* 2011)，可經由蚜蟲及種子傳播 (Broadbent *et al.* 1951; Couch 1955;

Nobel & Richardson 1968; Le-Gall 2003)，透過國際間種子交流與販售，分佈遍及全球萵苣栽培地區。感染 LMV 之萵苣，病徵會因植株品種、品系、感染病毒系統不同而有所差異 (Ainsworth & Ogilvie 1939; Grogan *et al.* 1952; Tomlinson 1962; Tomlinson 1970; Krause-Sakate *et al.* 2002; German-Retana *et al.* 2008; Soleimani *et al.* 2011)，主要產生嵌紋、皺葉、矮化等症狀，有時在葉片、中肋及莖部產生壞疽性斑點，嚴重危害時會導致種子減產 (Tomlinson 1962; Nobel & Richardson 1968)。

LMV 在自然界中可感染 9 科 24 種植物，其中萵苣、豌豆 (*Pisum sativum* L.)、菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 為經濟作物；人工接種則可感染 16 科 121 種植物 (Dianant & Lot 1992)。罹病之萵苣會因品種 (Grogan *et al.*

投稿日期：2014 年 9 月 12 日；接受日期：2014 年 12 月 27 日。

* 通訊作者：tsly@fthes-tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 高雄市。

² 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系助理研究員。台灣 高雄市。

1952; Tomlinson 1970)、植株感染株齡 (Couch 1955) 或環境因子之不同, 造成種子帶毒率有程度上之差異 (0–16%) (Neergard 1979; Dianant & Lot 1992)。為避免本病毒經由種子傳播, LMV 已被列為國際間萵苣種子進出口的重要檢疫對象 (Dianant & Lot 1992)。LMV 的檢測, 包括早期的指示植物病徵觀察 (Marrou & Messiaen 1967)、病組織切片觀察 (Edwardson 1992; Hunter & Bowyer 1993) 及血清學的應用等 (如酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) (Jafarpour *et al.* 1979; Falk & Purcifull 1983; Candresse *et al.* 2007)、放射線免疫吸附分析 (RISA) (Ghabrial & Shepherd 1982)、酵素連結螢光分析 (ELFA) (Dolores-Talens *et al.* 1989)、免疫吸附電子顯微鏡技術 (ISEM) (Br-lansky & Derrick 1979) 等技術。

材料與方法

本試驗之萵苣嵌紋病毒係採集自具明顯嵌紋、皺葉之葉萵苣樣品 (*Lactuca sativa var. crispa* L.), 加入 10× (W/V) 體積 0.1 M 磷酸鈉緩衝液 (Na-phosphate buffer, pH 7.4, 含 1% Na₂SO₃), 以手動研磨器或研钵磨碎葉片, 粗汁液磨擦接種於灑有 400 mesh 金鋼砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 或紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste and Reyn.), 於接種後 10–14 d 切取黃化單斑, 經過 3 次單斑分離後回接至健康之萵苣及圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana* Domin), 得到 7 個單斑病毒株 (1-3-1、2-2-1、1-3-4、5-2-5、2-3-2-1、3-3-2、3-2-1-1、4-3-3、4-3-2-4)。本試驗則以單斑系編號 3-2-1-1 為病毒接種及純化來源, 並以圓葉菸草做為病毒繁殖寄主及後續試驗之病毒接種來源。

單斑分離後之萵苣病毒依前述方法接種於莧科 (Amaranthaceae)、藜科 (Chenopodiaceae)、菊科 (Compositae)、十字花科 (Cruciferae)、葫蘆科 (Cucurbitaceae)、豆科 (Leguminosae) 及茄科 (Solanaceae) 等 7 科 27 種植物 (表 1), 其中萵苣、菠菜、豌豆及圓葉菸草產生系統性嵌紋病徵, 奎藜則表現系統性局部黃化斑點病徵, 紅藜及千日紅則為局部之壞疽斑

點病徵, 其餘供試植株均未產生任何病徵。萵苣於接種後 10 d 陸續出現葉脈透化、葉片嵌紋、黃化之系統性病徵, 菠菜、豌豆葉片則出

表 1. 萵苣嵌紋病毒於供試植物上之病徵表現。

Table 1. Symptoms of plants inoculated with *Lettuce mosaic virus*.

Test plant	Reaction ^z
Amaranthaceae	
<i>Amaranthus mangostanus</i>	—
<i>Gomphrena globosa</i>	L.L.
Chenopodiaceae	
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L.L.
<i>Chenopodium quinoa</i>	L.L./S
<i>Spinacia oleracea</i>	M/S
Compositae	
<i>Lactuca sativa</i> L.	M/S
Cruciferae	
<i>Brassica campestris</i> L.	—
<i>Brassica campestris var. chinensis</i>	—
<i>Brassica oleracea var. botrytis</i>	—
<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	—
<i>Brassica pekinensis</i>	—
<i>Raphanus sativus</i>	—
Cucurbitaceae	
<i>Citrullus vulgaris</i>	—
<i>Cucumis melo</i>	—
<i>Cucumis sativus</i>	—
<i>Cucurbita moschata</i>	—
<i>Luffa aegyptiaca</i>	—
Leguminosae	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	—
<i>Pisum sativum</i>	M/S
<i>Vigna unguiculata</i> “Black Eye”	—
Solanaceae	
<i>Capsicum annuum</i> L.	—
<i>Datura stramonium</i>	—
<i>Lycopersicon esculentum</i>	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	M/S
<i>Nicotiana glutinosa</i>	—
<i>Nicotiana rustica</i>	—
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Van Hicks	—

^z L.L.: local lesion; M: mosaic; S: systemic infection; —: no infection.

現黃綠相間之嵌紋病徵，葉片明顯變小，植株矮化。圓葉菸草於接種後 10 d 陸續出現葉色黃化、葉片捲曲、葉片嵌紋之系統性病徵。奎黎接種葉於 10–14 d 出現直徑 1–2 mm 之黃色局部病斑，接種葉下方之未接種葉及上方之新生葉亦散生黃色小斑，呈現系統性感染。紅藜接種葉於 10–14 d 出現直徑 1–2 mm 之黃色局部病斑，後擴大約 3–4 mm 並轉為具有紅色外環之壞疽斑點。千日紅於接種後 7 d 出現褪色斑點，後期呈現暗紅色外環之壞疽斑點，無系統性轉移。其餘供試植株均未產生任何病徵，且回接至紅藜上亦無任何病斑產生，確認為非寄主 (Marrou & Messiaen 1967; Tomlinson 1970; Le-Gall 2003)。

病毒增殖及純化

修飾 Tomlinson (1970) 和 Moghal & Francki (1976) 之方法純化 LMV。取 *Nicotiana benthamiana* 接種約 14–20 d 之病組織 200 g 放入 Waring blender，加入 2 倍 (W/V) 體積之 0.25 M 磷酸鉀緩衝液 (K-P buffer, pH 7.5) (內含 0.01 M EDTA, 0.1% Na_2SO_3)，打碎後以兩層紗布過濾，濾液分別加入等體積 (W/V) 氯仿及四氯化碳 (1:1)，再低速攪拌約 1 min 後，低速離心 10 min。上層液加入 Triton X-100 至 1%，於低溫中攪拌約 30 min，低速離心 10 min。取上清液緩慢加入墊有 5 mL 20% 蔗糖水溶液的離心管中，以 $166,800 \times g$ (Hitachi RP 50-2 rotor) 離心 60 min。沉澱物以 22 mL 0.05 MK-P buffer, pH 7.5 懸浮 (並以玻璃均質器溶浮均勻)，於低溫中攪拌約 30 min，離心 10 min。上清液加入硫酸銨 (最終濃度為 30%) 攪拌均勻後，以 $213,000 \times g$ (Hitachi RPS 40T rotor) 進行硫酸銨等密度梯度離心 16 h。觀察有無病毒條帶，如有白色霧狀帶，則以玻璃吸管吸取病毒條帶及附近液體，置入透析袋內以 0.01 M K-P buffer (pH 7.5) 透析 2 次，間隔約 2 h。低速離心 5 min (去除雜質)，分別將病毒原液及稀釋 10 倍病毒液以分光光度計測量 A_{260} 、 A_{280} 、 A_{320} 後，並以 $E(0.1\%, 1 \text{ cm}, 260_{\text{nm}}) = 2.4$ 為定量標準 (Lecoq & Pitrat 1985)。經過一系列的、低、高速離心、20% 蔗糖墊及 30% 硫酸銨等密度梯度離心後，距離

心管液面約 5–6 cm 處可見白色薄霧狀病毒帶，此為病毒存在處。以玻璃吸管收集病毒液，並以 K-P buffer 透析去除硫酸銨重金屬後，病毒原液以 $E(0.1\%, 1 \text{ cm}, 260 \text{ nm}) = 2.4$ 為病毒定量標準。經分光光度計 spectrophotometer 測量 A_{260}/A_{280} 約為 1.12。每 100 g 圓葉菸草病葉之病毒收量約 1.27 mg。

抗血清之製備

以電子顯微鏡觀察病毒濃縮液時雖然背景雜質不多，但以 SDS-PAGE 分析病毒鞘蛋白分子量大小時，除於 35 KDa 附近有病毒蛋白鞘分子條帶外，67 KDa 附近仍有疑似植物成分之蛋白帶，故參考 Laemmli (1970) 之方法，利用十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 分離純化高苜嵌紋病毒鞘蛋白分子為免疫源，委託濁水溪生物科技股份有限公司代工，以肌肉注射方式施打於紐西蘭白兔 (大小約 2 kg)，每 10–14 d 注射 1 次，連續注射 6 次。第 1 次注射之病毒鞘蛋白 (200 ug mL^{-1}) 以等量 (V/V) 之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 乳化後注射，中間 4 次均以不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 乳化病毒鞘蛋白 (100 ug mL^{-1})，最後 1 次注射則完全不加佐劑。注射第 6 針 7 d 後進行白兔心臟採血，所採血於 37°C 水浴靜置 1 h，低速離心 20 min 後吸取上層血清，保存於 -70°C 備用。

酵素連結免疫抗體分析

依 Koenig (1981) 之檢測步驟，進行上述抗血清之間接酵素連結免疫抗體分析，測試血清最適稀釋濃度。罹病菸草或高苜葉片加 10 倍體積 (W/V) 之 coating buffer ($1.59 \text{ g Na}_2\text{CO}_3$, 2.93 g NaHCO_3 , 0.2 g NaN_3 , $1 \text{ L H}_2\text{O}$, pH 9.6)，以手握式研磨器研磨，粗汁液低速離心 10 min 或靜置於 4°C 冰箱。將上述汁液加入 96 穴之微量盤中 (每穴加 0.1 mL)，放入保濕盒中，置於 37°C 定溫箱反應 4 h。取出微量盤並倒出液體，以 PBST 清洗 4 次。於每孔加入 0.2 mL 之 3% BSA (bovine serum albumin, 溶於 1/2 倍濃度的 coating buffer)，置於 37°C

定溫箱反應 2 h。微量盤清洗後加入以 conjugate buffer (2% PVP-40, 0.2% ovalbumin, 1 L PBST) 稀釋成不同濃度的血清, 置於 37°C 定溫箱反應 2 h。(並以購自 Agdia 公司之 LMV 抗體為反應對照) 以 PBST 清洗的微量盤加入以 conjugate buffer 稀釋成 5,000× 之抗體免疫球蛋白標識鹼性磷酸酵素 (goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma), 每穴加 0.1 mL, 置於 37°C 定溫箱反應 2 h。微量盤清洗後於每孔中加入 100 μ L 溶於 substrate buffer (97 mL diethanolamine, 800 mL H₂O, 0.16 g NaN₃, pH 9.8) 新鮮配製的 1 mg mL⁻¹ 鹼性磷酸酵素基質 (*p*-nitrophenyl phosphate disodium, Sigma), 於 37°C 反應 30 min, 以 ELISA 判讀儀 (機型 EmaxTM) 測其 OD_{405nm} 之

吸光值。

將自製 LMV 血清以 conjugate buffer 稀釋為 100×、500×、1,000×、2,000×、4,000×、5,000× 及 8,000× 不同濃度進行測試, 並以 Agdia 公司販售之 LMV 抗體為對照。結果顯示本試驗自製之 LMV 血清稀釋 5,000× 就可達到與 Agdia 公司販售之 LMV 抗體相同的檢測效果 (表 2)。以十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳純化的萵苣嵌紋病毒鞘蛋白分子為免疫源, 可減少抗血清與健康菸草及萵苣粗汁液產生假陽性反應 (Jafarpour *et al.* 1979; Falk & Purcifull 1983)。若以此濃度偵測罹病萵苣及圓葉菸草粗汁液, 病汁液稀釋倍數靈敏度可達 1/640 倍 (圖 1)。

表 2. 以間接 ELISA 分析法測試 LMV 抗血清最適稀釋濃度。

Table 2. The optimal dilution of LMV antiserum for indirect-ELISA.

Test sample ^z	anti-LMV					
	8,000×	5,000×	4,000×	2,000×	1,000×	200× (Agdia)
Diseased-10 d	0.454	1.030	1.573	1.809	2.529	0.906
Healthy-tobacco	0.023	0.041	0.138	0.207	0.361	0.017
Healthy-lettuce	0.016	0	0.028	0.044	0.063	0.007

^z Test plant: Diseased-10 d: the fresh leaf sample of *N. benthamiana* inoculated with LMV after 10 d; Healthy-tobacco: the fresh leaf sample of healthy *N. benthamiana*; Healthy-lettuce: the fresh leaf sample of healthy lettuce.

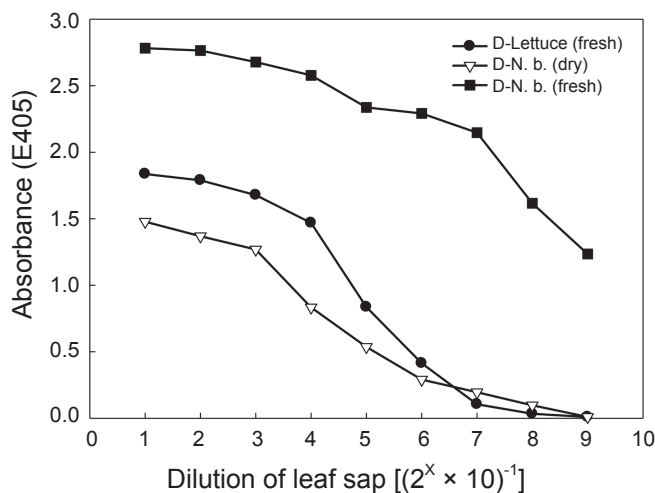


圖 1. 以 indirect-ELISA 及 LMV 抗血清測試罹病菸草及萵苣粗汁液可檢出之最高稀釋濃度 [(2^x × 10)⁻¹]。

Fig. 1. Sap dilution end points of LMV-infected plant were estimated by LMV antiserum and indirect-ELISA [(2^x × 10)⁻¹].

抗血清應用

種子帶毒率檢查

收集 10 批商業品種高苜種子，包括結球高苜 *L. sativa* var. *capitata* L.、不結球高苜 *L. sativa* var. *crisp* L. (平葉高苜、皺葉高苜) 及立生高苜 *L. sativa* var. *romana* Hort.，每 10 顆種子加入 0.3 mL coating buffer 置於 4°C 浸泡 2 h 後研磨，研磨液以低速離心 10 min，取 0.2 mL 上清液加入 96 孔穴微量盤 (每穴加 0.1 mL，共 2 穴)，利用上述間接酵素連結免疫分析法，以自製抗血清檢測高苜種子之 LMV 帶毒率。根據檢測結果：僅有一批平葉高苜種子未測出 LMV，其餘受檢測品種皆有程度不同的帶毒率，LMV 病毒檢出率介於 0–28% 之間 (表 3)。

表 3. 市售高苜種子之高苜嵌紋病毒帶毒檢定。

Table 3. Indexing of various seed lots of lettuce reacted with LMV antiserum in indirect ELISA.

Area	Lettuce variety	Percentage of seed contaminated (%)
Nantou	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i> L.	3
	<i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i> L.	28
	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i> L.	5
Taichung	<i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i> L.	8
	<i>L. sativa</i> var. <i>crispa</i> L.	11
Tainan	<i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i> L.	13
	<i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i> L.	7
Kaohsiung	<i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i> L.	13
	<i>L. sativa</i> var. <i>crispa</i> L.	0
	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>romana</i> Hort.	5

表 4. 間接 ELISA 分析法檢測不同高苜品種幼苗之 LMV 感染率。

Table 4. Incidence of LMV on seedlings of various lettuce varieties (*Lactuca sativa* L.) detected by indirect ELISA.

Lettuce variety	Total sample	Incidence of LMV (%)
Ho-Yeh	108	2.8
Ching-Tsuey	102	9.8
Liu-Li	105	13.3
Tsuey-Yu	101	0
Chu-Yeh	114	10.5
Pao-Hsin	100	9.0
Hsia-Kuan	94	3.2

穴盤苗帶毒率檢查

收集中部、南部市售高苜種子，分別播種至 40 穴穴盤內，約 30 d 後約長出 3–4 片本葉後，採其展開葉片以上述間接酵素連結免疫分析法，及自製抗血清檢測高苜種苗之 LMV 帶毒率。

檢測結果顯示：每品系皆有程度不同的 LMV 帶毒率，病毒檢出率介於 0–13.3% 之間 (表 4)。

高苜產區田間調查

於 2012 年 11 月至 12 月調查雲林縣麥寮鄉結球高苜產區病毒感染情形，隨機採集 113 株疑似罹病高苜葉片，其中有 42 個檢測樣本對於 LMV 抗血清呈現陽性反應，LMV 病毒檢出率達 37% (42/113)。

早期國外文獻顯示萵苣種子帶毒率若高於 0.1%，則本病害極可能很難防治 (Broadbent *et al.* 1951; Grogan *et al.* 1952; Tomlinson 1970)，若達 0.5% 帶毒率，再加上田間蚜蟲族群密度高，則可能導致全園無收成 (Zink *et al.* 1956; Neergard 1979)。美國官方已訂定萵苣種子帶有 LMV 之容許標準為 30,000 粒種子內不允許有一粒種子帶此病毒，而歐洲國家之容許標準則設定低於 0.1% (Dianant & Lot 1992)，才能又有效控制田間蔓延。由於使用無病毒種子對於預防萵苣嵌紋病有良好效果 (Grogan *et al.* 1952; Tomlinson 1962; Grogan 1980)，因此建議種苗生產公司與農民應建立無病毒種子篩檢制度，配合田間媒介昆蟲防治及其他肥培管理措施，應可有效降低本病之發生及其引起之農業損失。

引用文獻

- Ainsworth, G. C. and L. Ogilvie. 1939. Lettuce mosaic. *Ann. Appl. Biol.* 26:279–297.
- Brlansky, R. H. and K. S. Derrick. 1979. Detection of seed-borne plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Phytopathology* 69:96–100.
- Broadbent, L., T. W. Tinsley, W. Buddin, and E. T. Roberts. 1951. The spread of lettuce mosaic virus in the field. *Ann. Appl. Biol.* 38:689–706.
- Candresse, T., H. Lot, S. German-Retana, R. Krause-Sakate, J. Thomas, S. Souche, T. Delaunay, M. Lanneau, and O. Le-Gall. 2007. Analysis of the serological variability of Lettuce mosaic virus using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance technology. *J. Gen. Virol.* 88:2605–2610.
- Couch, H. B. A. 1955. Studies on seed transmission of lettuce mosaic virus. *Phytopathology* 45:63–70.
- Davis, R. M., K. V. Subbarao, R. N. Raid, and E. A. Kurtz. 2003. *Compendium of Lettuce Diseases*. APS Press. Pullman. 79 pp.
- Dianant, S. and H. Lot. 1992. Lettuce mosaic virus. *Plant Pathol.* 41:528–542.
- Dolores-Talens, A. C., J. H. Hill, and D. P. Durand. 1989. Application of enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) to detection of lettuce mosaic virus in lettuce seeds. *J. Phytopathol.* 124:149–154.
- Edwardson, J. R. 1992. Inclusion bodies. p.25–30. *in: Potyvirus Taxonomy*. (Barnett, O. W., ed.) Archives of virology, Supplementum 5. Springer-Verlag/Wein. New York. 450 pp.
- Falk, B. W. and D. E. Purcifull. 1983. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test to index lettuce mosaic virus in Florida. *Pant Dis.* 67:413–416.
- German-Retana, S., J. Walter, and O. Le-Gall. 2008. Lettuce mosaic virus: From pathogen diversity to host interactors. *Mol. Plant Pathol.* 9:127–136.
- Ghabrial, S. A. and R. J. Shepherd. 1982. Radioimmunosorbent assay for detection of lettuce mosaic virus in lettuce seed. *Plant Dis.* 66:1037–1040.
- Grogan, R. G. 1980. Control of lettuce mosaic with virus-free seed. *Plant Dis.* 64:446–449.
- Grogan, R. G., J. E. Welch, and R. Bardin. 1952. Common lettuce mosaic and its control by the use of mosaic-free seed. *Phytopathology* 42:573–578.
- Hunter, D. G. and J. W. Bowyer. 1993. Cytopathology of lettuce mosaic virus-infected lettuce seeds and seedlings. *J. Phytopathol.* 137:61–72.
- Jafarpour, B., R. J. Shepherd, and R. G. Groban. 1979. Serological detection of bean common mosaic and lettuce mosaic viruses in seed. *Phytopathology* 69:1125–1129.
- King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz. 2011. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press. San Diego. 1327 pp.
- Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55:53–62.
- Krause-Sakate, R., O. Le-Gall, H. Fakhfakh, M. Peypelut, M. Marrakchi, C. Varveri, M. A. Pavan, S. Souche, H. Lot, F. M. Zerbini, and T. Candresse. 2002. Molecular and biological characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology* 92:563–572.
- Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lecoq, H. and M. Pitrat. 1985. Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. *Phytopathology* 75:890–893.
- Le-Gall, O. 2003. Lettuce mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. No. 399. (Jones, A. T., D. J. Robinson, N. Boonham, and R. Mumford, eds.) Rothamsted Research, UK. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=399> (visit on 3/17/2010)
- Marrou, J. and C. M. Messiaen. 1967. The *Chenopodium quinoa* test: A critical method for detecting seed

- transmission of lettuce mosaic virus. Proc. Int. Seed Testing Assoc. 32:49–57.
- Moghal, S. M. and R. I. B. Francki. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses: I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. Virology 73:350–362.
- Neergard, P. 1979. Seed Pathology, Vol. I. The Macmillan Press. London. 839 pp.
- Nobel, M. and W. J. Richardson. 1968. An Annotated List of Seed-borne Diseases. Phytopathological Paper 8. Commonwealth Mycological Institute. Norwich. 191 pp.
- Soleimani, P., G. Mosahebi, and M. K. Habibi. 2011. Identification of some viruses causing mosaic on lettuce and characterization of *Lettuce mosaic virus* from Tehran province in Iran. Afr. J. Agric. Res. 6:3029–3035.
- Tomlinson, J. A. 1962. Control of lettuce mosaic by the use of healthy seed. Plant Pathol. 11:61–64.
- Tomlinson, J. A. 1970. Lettuce Mosaic Virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No. 9. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biology. Kew. 4 pp.
- Zink, F. W., R. G. Grogan, and J. E. Welch. 1956. The effect of the percentage of seed transmission upon subsequent spread of lettuce mosaic virus. Phytopath. 46:662–664.

Preparation and Application of Polyclonal Antibody on *Lettuce mosaic virus*

Li-Yu Tsao^{1,*} and Jaw-Neng Lin²

Abstract

Tsao, L. Y. and J. N. Lin. 2015. Preparation and application of polyclonal antibody on *Lettuce mosaic virus*. J. Taiwan Agric. Res. 64(2):159–166.

Lettuce mosaic virus was isolated and identified from infected lettuce plants (*Lactuca sativa* var. *crisp*. L.) by using host reactions, electron microscopy, biological and serological assays in Taiwan. Upon artificial inoculation to 27 plant species belonging to 7 families, the virus infected lettuces (*Lactuca sativa* var. *asparagina*, *L. sativa* var. *capitata*, *L. sativa* var. *crispa*, and *L. scariola* var. *sativa*), spinach (*Spinacea oleracea*), pea (*Pisum sativum*) and tobacco (*Nicotiana benthamiana*) showed systemically mosaic symptoms. It developed systemically yellow lesions on *Chenopodium quinoa*, but only local necrotic lesions displayed on *C. amaranticolor* and *G. glodosa*. No other tested plants with symptoms were observed. The virus coat protein was purified by SDS-PAGE, from which the antiserum against LMV was produced. The titer of the antiserum against homogenous antigen in the crude sap was 5,000, tested by the indirect ELISA. The dilution end point of the crude sap detected by the antiserum was 1/640. Ten commercial lettuce seed lots were tested with the antiserum and the incidence of LMV was determined in range of 0–28%. Seven lots of lettuce seedlings collected from markets. Among them, 0–13.3% of the seedlings were positive to the LMV when detected by the antiserum. By testing 113 lettuce plants randomly collected from Mailiao Township of Yunlin County, the incidence percentage of LMV was 37%.

Key words: *Lactuca sativa* L., *Lettuce mosaic virus*, Antiserum, Detection.

Received: September 12, 2014; Accepted: December 27, 2014.

* Corresponding author, e-mail: tsly@fthes-tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Department of Vegetables, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.