

應用聚合酶連鎖反應及核酸探針雜配法偵測齒舌蘭輪斑病毒

張清安^{1,2}、曾雅詩¹、陳金枝¹、鄧汀欽¹

1. 台中縣霧峰鄉 台灣省農業試驗所植物病理系
 2. 聯絡作者：電子郵件 cachang@wufeng.tari.gov.tw；傳真 04-3331089
- 接受日期：中華民國 88 年 2 月 1 日

摘 要

張清安、曾雅詩、陳金枝、鄧汀欽. 1999. 應用聚合酶連鎖反應及核酸探針雜配法偵測齒舌蘭輪斑病毒. 植病會刊 8:29-36.

蘭花乃目前廣受各方歡迎之觀賞植物，在已知感染蘭花之 25 種病毒中，齒舌蘭輪斑病毒 (odontoglossum ringspot tobamovirus, ORSV) 被認為是影響蘭花經濟生產之主要病毒。傳統上採用免疫檢定法偵測 ORSV 之感染多能獲致良好結果，但近年來發現利用免疫檢定法並無法將部分組織培養中感染 ORSV 之蘭花幼苗順利檢出，推測此可能與組織培養幼苗體內病毒濃度偏低而超出免疫檢定法之敏感極限有關。本研究嘗試發展敏感度高於免疫檢定法之核酸探針雜配法 (DNA probe hybridization) 與反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription—polymerase chain reaction, RT-PCR) 供 ORSV 之偵測。試驗中根據已知之 ORSV 鞘蛋白基因之核酸序列，設計一對可以由 ORSV RNA 中增幅獲得一段約 372 bp 之核酸產物之專一性引子對 (OS-1/OS-4)，其中 OS-4 乃對應 ORSV 鞘蛋白基因核酸位置 358-375 之互補股引子，其序列為 5'-TCTTATTGCTACAGTTGC-3'，而 OS-1 則為對應核酸位置 4-21 之病毒股引子，序列為 5'-TCTTACACTATTACAGAC-3'。此引子對於 95 C 變性 1 分鐘，50 C 黏合 1 分鐘及 72 C 聚合 2 分鐘且經 26 個循環之反應條件下，確實可由感染 ORSV 之蝴蝶蘭、文心蘭、嘉得利亞蘭、報歲蘭、及素心蘭等五種蘭花葉片組織所抽取之全量 RNA 中，增幅獲得與預估值相符之核酸產物，而同樣條件下對於感染 CyMV 或健康無病毒蘭花之 RNA 試料則未獲得任何產物。將上述由 ORSV RNA 增幅所獲之 DNA 產物選殖於 pUC18 載體，並轉型於 *E. coli* DH5 菌株中，利用商業化之 DIG 標定程序，由轉型株合成出含該 DNA 片段之非放射性核酸探針。此核酸探針與上述感染 ORSV 之五種蘭花組織之全量 RNA 可產生專一性雜配反應，但與健康對照及本省常見之二種 tobamoviruses，包括 cucumber green mottle mosaic tobamovirus (CGMMV) 及 tobacco mosaic tobamovirus (TMV) 並不呈現任何正反應訊號。試驗中利用蘭花汁液稀釋定量之 ORSV 純化病毒，分別以 ELISA、核酸探針雜配及 RT-PCR 進行偵測並比較三者之敏感度，結果證實三者中以 RT-PCR 之敏感度最高，其可偵測之最低病毒濃度極限接近 1 fg/ml，為 ELISA 的 10^7 倍，而為核酸探針雜配法之 10^3 倍。另外 OS-1/OS-4 引子對除可偵測 ORSV 外，並可與 CGMMV 之 RNA 反應，於相同之 RT-PCR 程序下增幅出一接近 400 bp 之 DNA 產物，但不與 TMV 之 RNA 產生任何反應，顯示此引子對與本實驗所發展之 RT-PCR 程序未來亦可應用於相關 tobamoviruses 之鑑別。

關鍵字：齒舌蘭輪斑病毒、反轉錄聚合酶連鎖反應、核酸探針雜配法、病毒、偵測、蘭花

緒 言

蘭花乃蘭科觀賞植物之總稱，此科植物種類繁多，已知者達七百多屬三萬餘種以上，由平地直至三千公尺以上高山均有其蹤跡 (1, 21)。台灣為多種蘭花之原生地，其中以蝴蝶蘭尤為著名，近年來其人工栽培已發展成為世界知名之外銷產業。文獻上記載可以感染蘭屬植物之病毒超過 25 種以上 (1, 16, 21)，但是成為經濟栽培之限制者以齒舌

蘭輪斑病毒 (odontoglossum ringspot tobamovirus, ORSV) 及東亞蘭嵌紋病毒 (cymbidium mosaic potexvirus, CyMV) 為代表 (1, 9, 16, 21)。此二種病毒性質穩定，以機械傷口接觸方式傳染 (11, 18)，近年來蘭花栽培大量使用無性繁殖法以組織培養快速繁殖種苗，更造成此二病毒目前之世界性分佈，對蘭花產業之危害日形嚴重 (1, 16, 21)。由於多種因素之影響，蘭花感染病毒後並不一定顯現可辨識之

癥狀，因此感染與否之判斷必須仰賴較精密之檢定技術方能確定 (1, 16, 21)。多年來國際間蘭花產業一直以免疫技術為主要病毒檢定方式，我國亦早在 1990 年起即由本研究室負責技術指導及抗血清製備 (7)，於全省多處試驗改良場所設立蘭花病毒檢定站，為蘭花栽培業者服務 (2)。根據過去之經驗，部分蘭花在組織培養期間以免疫技術檢測時並未出現病毒感染反應，但是當幼苗出瓶正常生長後卻立刻被檢出病毒存在，顯示蘭花種苗於組織培養期間之病毒濃度可能偏低，造成免疫技術無法將病毒順利檢出，因此提升病毒檢定技術之敏感度或許是解決此問題之可能途徑。近年來分子生物學上廣泛應用之聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 或反轉錄 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) (10) 及核酸探針雜配法 (DNA probe hybridization) (14) 其敏感度優於免疫檢測法早為各方肯定，其中蘭花病毒 CyMV 之 PCR 檢定技術已發展成功，並實際應用於產業中 (17)。而 ORSV 之 PCR 檢定技術雖已有報導 (5)，但其流程經本實驗室之數度嘗試，其結果均未盡理想。故嘗試自行發展此二技術於蘭花病毒 ORSV 之檢定，並與免疫法比較敏感度差異，結果證實所發展之 RT-PCR 檢定流程確實具有高度敏感與專一性，其中部分結果已經摘要發表 (3)。本文詳細闡述所發展之 RT-PCR 引子對之序列，非放射性墨點雜配法與 RT-PCR 之各項反應條件與流程，並就其實用性加以討論，以供產業上實際應用之參考。

材料及方法

病毒來源及純化

供試病毒 ORSV 乃源自蝴蝶蘭之分離株，經三次單斑分離後即接種保存於煙草 (*Nicotiana benthamiana*) 上作為試驗材料 (7)。實驗過程除 ORSV 外，亦將本省普遍存在之二種 tobamoviruses 如感染茄科作物之煙草嵌紋病毒 (tobacco mosaic tobamovirus, TMV) 及瓜類作物之胡瓜綠斑嵌紋病毒 (cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV) 列入試驗比較，此二病毒均為本實驗室過去長期分離保存之實驗材料 (4)。純化病毒顆粒時乃將 ORSV 大量繁殖於 *N. benthamiana* 上，採取接種 14 天後之葉片以二倍量 (v/w) 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (KPB), pH 7.5, 內含 0.25 % (w/w) 之 Na_2SO_3 用果汁機打碎，再加入一倍量 (v/w) 冰冷之 chloroform 及 carbon tetrachloride 等量混和溶液後高速打碎一分鐘，所得汁液以 3,500 g 離心 5 分鐘，取上清液以紗布過濾，再經一次 13,200 g 離心 10 分鐘進一步去除雜質，其後於上澄液中加入 polyethylene glycol (MW 6000)、NaCl 及 Triton X-100 使其濃度分別成為 40 % (w/v)、200 mM 及 2 % (v/v)，於 4 C 下攪拌 60 分鐘，再以 13,200 g 離心 10 分鐘取得沈澱物，將其溶解於 10 mM

KPB (pH 7.5) 中，其不溶解物以 13,200 g 離心 10 分鐘去除後，再以 Cs_2SO_4 平衡離心法取得最終之純化病毒 (6)。純化之病毒顆粒懸浮於 pH 7.5 之 10 mM KPB 中。

病毒及植物全量 RNA 之製備

將純化之病毒與 disruption buffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, pH 7.8) 均勻混合，在 60 C 下加熱 5 分鐘，以 phenol/chloroform 萃取二次以純化其 RNA，再以 95 % 酒精沈澱後溶解於無菌水中 (19)。

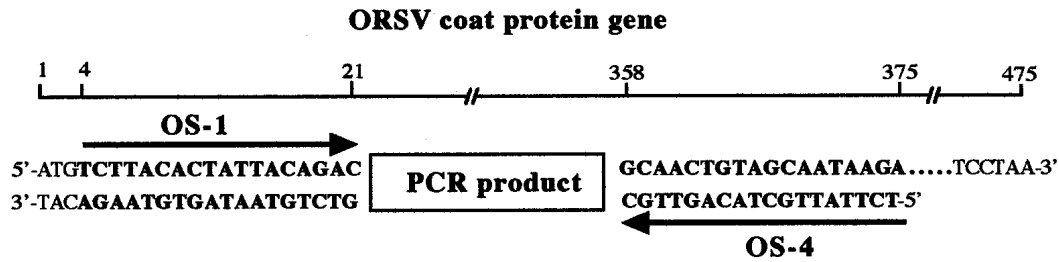
植物全量 RNA 之製備則是將植株葉片於液態氮中研磨成粉狀，加入 extraction buffer (1 M Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, pH 8.0) 均勻混合，於 70 C 下加熱 5 分鐘，再以 phenol/chloroform 萃取其 RNA，最後以 95 % 酒精沈澱後溶解於無菌水中。

RT-PCR 偵測

本試驗所使用之引子對 OS-1/OS-4 乃根據已知之 ORSV RNA 核殼酸序列 (8) 所設計者，其序列分別為 OS-1 : 5'-TCTTACACTATTACAGAC-3'，OS-4 : 5'-TCTTATTGCT ACAGTTGC-3'。此二引子之序列與 ORSV 鞘蛋白基因核殼酸序列之相關位置及 PCR 增幅後之 DNA 產物預估值詳示於圖一。於病毒 RNA 或植物全量 RNA 中加入 1 pmol 之引子 OS-4，利用反轉錄試劑組 (Stratagene Inc., La Jolla, CA)，合成第一股 cDNA。進行 PCR 反應時，每 50 μl 之反應液中分別加入 2 μl cDNA、5 μl 10x PCR buffer、10 mM dNTP、0.5 U Ex-Taq polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 及 2.5 μl 之 20 μM OS-1/OS-4 引子對，於 Perkin-Elmer 熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) 進行 26 個 PCR 循環反應，每一反應之程序分別為 95 C 下變性 1 分鐘，50 C 下黏合 1 分鐘，72 C 下聚合 2 分鐘，最後之循環中 72 C 聚合反應延長為 10 分鐘。PCR 反應後產物以電泳法進行分析，其程序乃遵照一般標準分子生物技術進行 (19)。

核酸探針之製備

以純化之 ORSV 病毒核酸為模版，經上述 PCR 程序所增幅之 DNA 產物，以 *EcoRI* 切割後構築於 pUC18 載體中，經由轉形作用送入 *E. coli* DH 5 宿主，先利用藍白菌落反應初步選出可能含有嵌入序列之選殖菌株，再經由微量質體純化分析，進一步選出確定之轉型菌株 (19)。製備 ORSV 之核酸探針時乃將上述轉型菌株之質體加以純化，再以 *EcoRI* 切取嵌入之 ORSV 核酸片段，利用非放射性 DIG DNA labeling kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) 將核酸加以 DIG 標定，而製



圖一、反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 中增幅齒舌蘭輪斑病毒 (ORSV) 之專一性引子對 OS-1/OS-4 之核酸序列及其在 ORSV 鞘蛋白基因中之相關位置與方向。

Fig. 1. Schematic demonstration of a primer pair OS-1/OS-4 designed in this study for the detection of odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The reaction would result in a 372 base pair (bp) PCR product. Arrow heads and bars indicate the orientation and length of the primers, respectively. The relative position of PCR amplification in the coat protein gene of ORSV is indicated on the top of the figure.

成檢測 ORSV 之核酸探針，DIG 標定與探針製備過程乃遵照廠商所建議之步驟進行。

非放射性墨點雜配 (Non-isotopic dot blot hybridization)

待測之植物組織中之全量 RNA 依前述方法純化後，利用 Millipore 墨點轉漬設備 (MilliBlot-D Transfer system, Millipore Corp., Bedford, MA) 將其點著於 nylon 膜 (Stratagene Inc., La Jolla, CA) 上，經 UV cross linker 作用後置入玻璃滾筒內，進行非放射性雜配反應。雜配反應所使用之核酸探針為上述經 DIG 標定之 ORSV 384 bp DNA 片段，使用濃度為 5~25 ng/ml。整個雜配反應之程序與藥品配置均依照廠商 (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) 之建議進行。雜配反應結果亦以廠商建議之 NBT/X-phosphate 呈色方式進行 (DIG DNA detection kit, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)。

抗血清來源與酵素連結免疫分析法

試驗中使用之 ORSV 抗血清乃以純化之病毒顆粒免疫注射於家兔體內所製作而成，病毒純化步驟與抗血清製作方法已於過去之報告中述明 (6, 7)。試驗中所採用之酵素連結免疫分析法 (ELISA) 乃遵照間接式 (antigen-coating indirect ELISA) 程序進行 (6)。比較 RT-PCR、核酸探針雜配法與 ELISA 三者間之敏感度時，乃將純化之定量病毒與健康植物汁液混合，調製成十倍稀釋濃度系列，再依上述方法進行檢測，以試驗出三者之最終反應濃度。

結 果

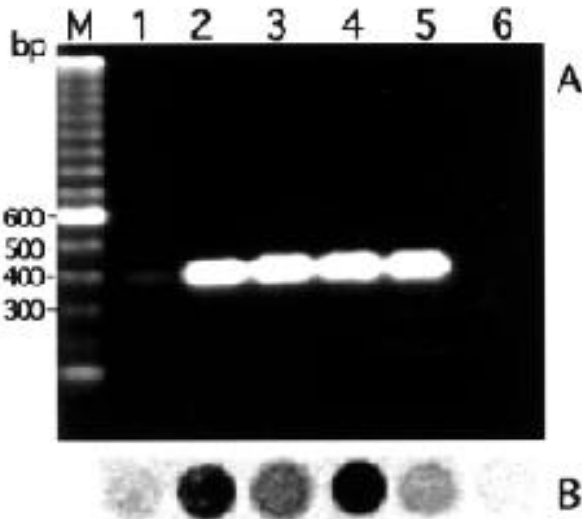
RT-PCR 檢測 ORSV

依據 ORSV 鞘蛋白基因核酸序列所設計之 OS-

1/OS-4 引子對，預估可於 RT-PCR 後獲得一約 372 bp 之 DNA 產物 (圖1)，實際試驗後之電泳分析結果，證實以純化之病毒 RNA 為模版，可獲得一與預估值相符之 DNA 片段 (結果未出示)。若以感染 ORSV 之蝴蝶蘭、文心蘭、嘉得利亞蘭、報歲蘭、及素心蘭等五種蘭花葉片組織所抽取之全量 RNA 為模版，亦均可分別獲得分子量相符之 DNA 產物，而於健康對照植物所抽取之全量 RNA 則未獲得任何類似產物 (圖2A)。圖2A中蝴蝶蘭試料所增幅之 PCR 產物濃度較其他試料低，此與該特定標本中 ORSV 之濃度偏低有關，而與 OS-1/OS-4 引子對之專一性或反應條件之適用性應無關係，因為在重複試驗中其他蝴蝶蘭試料並無此現象。另外 OS-1/OS-4 引子對在相同反應條件下與蘭花中另一常見之病毒 CyMV 並不會產生任何反應產物 (未出示之結果)。

ORSV 之 RT-PCR 產物之選殖與雜配反應分析

本試驗於 OS-1 及 OS-4 序列之上游 5' 端分別加入 *EcoRI* 切位之序列，形成一組專供選殖 PCR 反應產物之引子對，再利用純化之 ORSV RNA 為模版進行 PCR 反應，將增幅獲得之 DNA 片段，構築於 pUC18 載體之 *EcoRI* 切位，再轉型至 *E. coli* DH 5 宿主中，經篩選並以電泳分析確定後選取一轉型菌株 (ORS 14) 作為供試菌株。此菌株經上述培養純化及 DIG 標定程序可獲得一約 400 bp 之 DNA 探針，命名為 OP-14。經非放射性核酸雜配反應後顯示，此核酸探針確實可與前述感染 ORSV 之五種蘭花組織之全量 RNA 產生專一性雜配反應，而與健康對照不產生任何反應 (圖2B)。圖2B中 OP-14 與文心蘭、嘉得利亞蘭、報歲蘭、及素心蘭之試料均產生強烈雜配反應，而與蝴蝶蘭試料反應較弱，但其顯色濃度仍明顯高於健康對照，此應為該特定蝴蝶蘭試料中 ORSV 濃度較低所致，因為在重複試驗中 OP-14 與其他蝴蝶蘭試料之反應均極為強烈，此項結論亦可由圖 2A 中同一蝴蝶蘭試料之 PCR 產物濃度偏低而獲得印證。



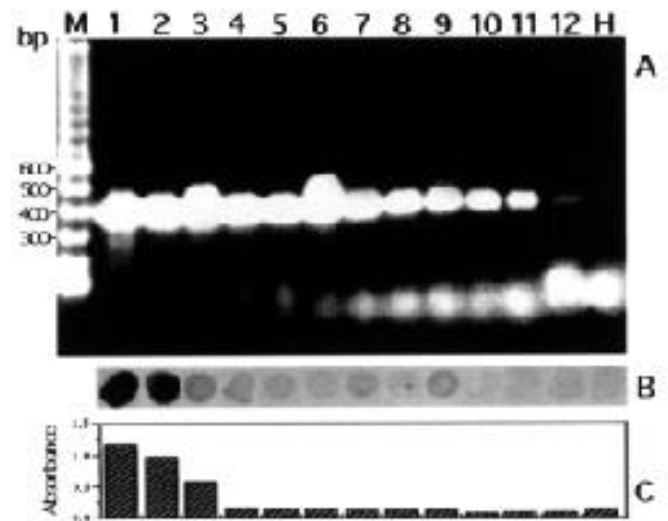
圖二、應用反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 及核酸探針墨點雜配法 (dot blot hybridization) 偵測感染齒舌蘭輪斑病毒 (ORSV) 之五種不同蘭花。(A) M 行乃標準 100 bp DNA 梯級標誌；行 1-6 分別代表感染 ORSV 之蝴蝶蘭、文心蘭、嘉德利亞蘭、素心蘭、報歲蘭及健康無病毒感染之蝴蝶蘭葉片組織之 RT-PCR 反應產物經電泳分析之結果。(B) 由左至右乃對應圖 (A) 1 至 6 行等五種蘭花及健康對照之葉片組織全量 RNA 抽出物與 ORSV 核酸探針 OP-14 進行墨點雜配反應之顯色結果。RT-PCR 及 dot blot hybridization 之程序與反應條件詳見本文所述。

Fig. 2. Dot blot hybridization and 0.8% agarose gel electrophoresis of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) products derived from different orchid species infected with odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV). RT-PCR was conducted as described in the text using the primers (OS-1/OS-4) designed in this study. Dot blot hybridization was done with non-isotopic DIG labeled DNA probe (OP-14), which was cloned and processed from the PCR product amplified from ORSV RNA by OS-1/OS-4 primers. (A) Electrophoresis analyses of RT-PCR products from ORSV-infected orchid species amplified by OS-1/OS-4 primers. Lane M, 100 bp DNA ladder; Lanes 1-5 are the RT-PCR product from *Phalaenopsis hybrida*, *Oncidium hybrida*, *Cattleya hybrida*, *Cymbidium ensifolium*, and *Cymbidium sinensis*, respectively; Lane 6 is virus-free control tissue of *Phalaenopsis hybrida*. (B) Hybridization of OP-14 with total RNAs extracted from the five different ORSV-infected orchid species as in (A). Dot blots from left to right correspond to the orchid species and the healthy control as from lane 1-6 of (A).

ELISA、非放射性墨點雜配及 RT-PCR 方法敏感度之比較

將純化之 ORSV 病毒與健康蝴蝶蘭汁液混合進行 10x 系列稀釋，成為 12 種由 100 ug/ml 至 1 fg/ml 之不同濃度稀釋液，再分別以 ELISA、非放射性墨點雜配及 RT-PCR 進行偵測；結果發現 ELISA 可偵測之最低病毒濃度介於 1

ug/ml~100 ng/ml 之間 (圖3C，試料 3 與 4 之間)。以 OP-14 探針行非放射性墨點雜配，可偵測之最低病毒濃度位



圖三、酵素聯結抗體吸附反應 (ELISA)、非放射性墨點雜配反應 (non-isotopic dot blot hybridization) 及反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 於偵測齒舌蘭輪斑病毒 (ORSV) 之敏感度比較。本試驗將純化之 ORSV 病毒由 1 mg/ml 開始以健康蝴蝶蘭葉片汁液稀釋為 12 種十倍系列稀釋濃度，再分別以以上三種方法進行病毒偵測。(A) RT-PCR 反應後產物之電泳分析結果；M 行乃標準 100 bp DNA 梯級標誌；1-12 行分別為 100 ug/ml, 10 ug/ml, 1 ug/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1 pg/ml, 100 fg/ml, 10 fg/ml 及 1 fg/ml 等 12 種不同濃度之樣品；H 行為對照用健康蝴蝶蘭葉片汁液。(B) 由左至右乃對應 (A) 圖中 1-12 行 12 種不同濃度病毒汁液經非放射性墨點雜配反應後顯色之結果，H 為對照健康蝴蝶蘭汁液之反應結果。(C) 由左至右乃對應 (A) 與 (B) 圖中樣品 1-12 及 H 健康對照之 ELISA 反應值，反應值為加入酵素基質 120 分鐘後於 405 nm 波長下所測得之吸光度。

Fig. 3. Comparison of the sensitivity in detection of odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) by ELISA, non-isotopic dot blot hybridization, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). ORSV was prepared in a 10-fold dilution series of purified virions (1 mg/ml) by mixing with healthy *Phalaenopsis* orchid leaf sap. These samples were then processed for the detection of ORSV by the three different methods as described in the text. (A) Electrophoresis of the RT-PCR products from 12 samples varying in ORSV concentration. Lane M, 100 bp DNA ladder; Lanes 1-12 are PCR product from samples with ORSV concentration at 100 ug/ml, 10 ug/ml, 1 ug/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1 pg/ml, 100 fg/ml, 10 fg/ml and 1 fg/ml, respectively. Lane H is *Phalaenopsis* orchid leaf saps used as healthy control. (B) Results of dot blot hybridization of the samples with different concentrations of ORSV. Dot blots from left to right correspond the samples as in lanes 1-12 and healthy control of (A). (C) Results of ELISA as determined by absorbance value at 405 nm of the samples corresponding to lanes 1-12 of (A).

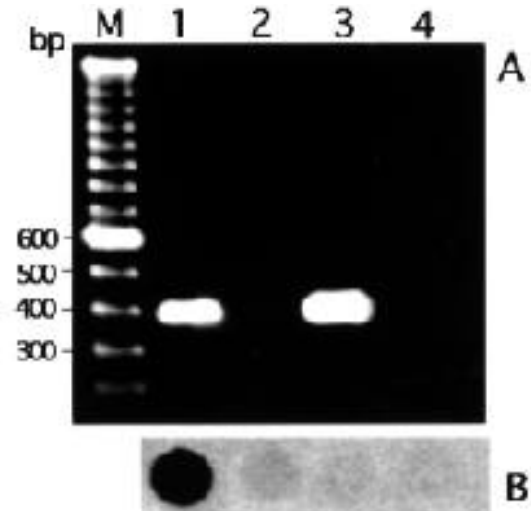
於 10 ng/ml~1 ng/ml (圖3B, 試料 9 與 10 之間)。而 RT-PCR法則可由前 11 種系列稀釋試料中獲得強烈且與預估值相符之專一性產物 (圖 3A, 試料 1 至 11), 而最終之稀釋試料雖仍可依稀測得相同之增幅產物, 唯其強度已接近判別臨界值, 顯示該病毒濃度 (1 fg/ml) 已接近 RT-PCR 法之偵測敏感終點。本試驗結果顯示 RT-PCR 法確為三者中敏感度最高者, 其敏感度估計約為 ELISA 之 10^7 倍, 為非放射性墨點雜配之 10^3 倍。試驗中發現非放射性墨點雜配法在病毒濃度低於 100 ug/ml 後其顯色之強度急遽減弱 (圖3B, 試料 3 至 9), 雖與無病毒對照間仍有明顯差異, 但與圖3A之 PCR 結果比較, 其正反應之判別顯然較為困難。

ORSV 之探針及引子對與其他 tobamovirus 病毒之交叉反應

利用上述 OP-14 探針與本省常見之二種 tobamoviruses (CGMMV及TMV) 之感病煙草全量 RNA 進行非放射性墨點雜配反應, 結果其反應訊號與無病毒對照之背景值無法區別 (圖4B, 試料 2 至 4), 顯示彼此間並無任何雜配反應發生, 而 OP-14 僅與同源之 ORSV RNA 產生強烈反應 (圖4B, 試料 1)。若以 OS-1/OS-4 引子對與 CGMMV 及 TMV進行 RT-PCR反應, 則 CGMMV 可被增幅出一接近 400 bp 之 DNA 產物, 與對照 ORSV 所獲得之產物大小相仿, 而 TMV 則未有任何訊息出現 (圖4A)。上述結果顯示在 OP-14 所對應之鞘蛋白基因區間, ORSV 與CGMMV 或 TMV 之同源性 (homology) 可能有明顯之差異, 故彼此間未能產生雜配反應。然而在此區間之上下游兩端序列 (flanking sequence) 中, ORSV 與 CGMMV 較為接近, 而仍與 TMV 有顯著差異, 因此 RT-PCR 反應後只有 CGMMV 與對照 ORSV 相同, 可獲得與預估值相符之 DNA 產物。

討 論

齒舌蘭輪斑病毒 (ORSV) 及東亞蘭嵌紋病毒 (CyMV) 乃被公認為影響全球蘭花產業之重要病毒 (1, 9, 16, 21), 其中尤以 CyMV 更獲得蘭花主要栽培地區如新加坡、泰國及夏威夷等之重視, 有關此病毒之檢定與防治之研究報導極多 (5, 12, 13, 17, 20), 其中 CyMV 之核酸探針及 RT-PCR 檢定法早已發展成功 (5, 17, 20), 且證實其敏感度優於傳統之免疫抗體檢定法。至於 ORSV 之核酸檢定報告較少, 此可能與 ORSV 為 tobamoviruses 之一種, 而一般 tobamoviruses 在感病組織中之濃度相當高 (9, 18), 故檢定上應用傳統免疫抗體法之敏感度即已足夠, 發展核酸檢定之必要性未被優先考慮。另外 ORSV 在部分國家之蘭花產業上之重要性低於 CyMV, 因此未被列為優先發展對象, 例如以栽培石斛蘭為主之新加坡與夏威夷, 均因



圖四、OS-1/OS-4 引子對及 OP-14 探針於反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 及墨點雜配法 (dot blot hybridization) 中與煙草嵌紋病毒 (TMV) 及胡瓜綠斑嵌紋病毒 (CGMMV) 之交叉反應。(A) 應用 OS-1/OS-4 引子對與 ORSV、TMV 及 CGMMV 等三種 tobamoviruses 進行 RT-PCR 反應後其產物之電泳分析結果; M 行乃標準 100 bp DNA 梯級標誌; 1-4 行分別為引子對與 ORSV, TMV 及 CGMMV 之病毒 RNA 及對照健康無病毒煙草全量 RNA 反應結果。(B) 由左至右四組墨點乃應用 OP-14 探針與對應 (A) 圖中 1-4 行之三種病毒 RNA 及對照煙草全量 RNA 進行雜配反應後之顯色結果。

Fig. 4. Reaction of primer pair (OS-1/OS-4) and DNA probe (OP-14) with odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV), tobacco mosaic tobamovirus (TMV), and cucumber green mottle mosaic tobamovirus (CGMMV) in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and dot blot hybridization. RT-PCR was conducted as described in the text using the primers (OS-1/OS-4) designed for the detection of ORSV. Dot blot hybridization was done using non-isotopic DIG-labeled DNA probe (OP-14), which was cloned and processed from the PCR product amplified from ORSV RNA by OS-1/OS-4 primers. (A) Electrophoresis analyses of RT-PCR products of three different tobamoviruses reacting with OS-1/OS-4 primers. Lane M, 100 bp DNA ladder; Lanes 1-3 are PCR products of ORSV, TMV and CGMMV, respectively; Lane 4 is the control reaction by substituting RNA template with distilled water. (B) Hybridization of DNA probe (OP-14) with viral RNA of the three different tobamoviruses. Dot blots from left to right correspond to the RNA as in lanes 1-4 of (A).

ORSV 無法感染大部分石斛蘭商業品種, 而將其視為非重要性病原 (13)。反之, 本省所栽培之多項蘭種包括最具經濟發展潛力之蝴蝶蘭與文心蘭, 均可被 ORSV 危害, 其重要性不亞於 CyMV (1, 2), 且由於 ORSV 在病組織中濃度之變化較不穩定, 有時應用免疫檢定法所測得之濃度常接近臨界值, 在判定有否感染時常有困擾 (張清安, 未發表資料), 因此我們認為發展除了抗血清檢定外的另一種

檢定方式，一則提升檢定敏感度與結果重現性，一則作為輔助免疫檢定之判別依據，對本省蘭花產業之發展是需要的。

本研究根據已發表之 ORSV 之鞘蛋白核殼酸序列中之較保留區域設計出一對各含 18-mer 之引子，此引子對預計可由同源病毒之 RNA 中增幅出 372 bp 之 DNA 產物。經實際 RT-PCR 反應結果，的確可獲得與預估值相符之產物，而此引子對並不與健康對照或感染 CyMV 之蘭花產生任何反應，對所測試之五種感染不同蘭花之 ORSV 分離株，均能獲得預期產物，另外與 20 餘個不同地區來源之蝴蝶蘭 ORSV 分離株，亦可穩定獲得相同結果（未出示之結果），顯示所設計之引子對確實對 ORSV 病毒具有良好之專一性與廣效性，並不會因不同蘭種或不同來源地區而有所差異，此特性已使本項技術具有實際應用之價值。當然本試驗僅針對本省廣泛栽培之蘭種上之 ORSV 分離株加以測試，現實上無法涵蓋所有蘭種上之 ORSV 分離株，也無法遍及其他國家地區之分離株，因此我們還無法全面排除此引子對與部分 ORSV 分離株不發生反應之可能性，不過基於多數研究報告指出不同地區 ORSV 分離株之鞘蛋白基因序列同源性極高 (5, 15)，推測發生漏檢之機率應該不高。另外本研究亦測試此引子對對於本省常見之二種 tobamoviruses 之反應專一性，發現可與 CGMMV 反應而不與 TMV 反應，由於 CGMMV 只能感染瓜類作物而不會出現在蘭花上，因此此引子對雖可在控制之情況下與 CGMMV 反應，實際於蘭花產業上應用時，應不會發生鑑別上之困擾。相反的，目前仍有學者認為有部分 TMV 分離株可感染蘭花，甚至認為蘭花上之 ORSV 即為 TMV 之一種分離株，而非獨立之一種病毒 (9, 16)。然而根據本試驗之 RT-PCR 結果，推測縱使有部分 TMV 分離株會感染蘭花，OS-1/OS-4 引子對仍具足夠之專一性可將 ORSV 與 TMV 加以區別。

本試驗中將 OS-1/OS-4 引子對與 ORSV 反應所增幅之 DNA 片段加以選殖並製備成非放射性核酸探針 OP-14，測試結果證實其可與所有已測試之 ORSV 分離株產生雜配反應（結果未出示），但不與其他二種 tobamoviruses 之 RNA 反應，顯示此探針之廣效性與專一性已具備實用化之雛形。然而結果亦顯示探針雜配法之偵測敏感度仍然明顯低於 RT-PCR 法，而且由於本試驗為顧及使用安全性，所發展者屬非放射性之墨點雜配法，其與健康蘭花反應之背景值仍然偏高，尤其在病毒濃度較低之試料中其顯色強度並不明顯，因此其實用性仍有待加強。此原因除推測可能是 OP-14 探針之核殼酸長度僅為 384 bp，稍嫌不足，若能適度增加長度則其專一性可能有進一步提升之空間，未來非放射性雜配法本身之顯色強度，亦有改進提升之必要。

另外由 OS-1/OS-4 引子對亦可增幅 CGMMV RNA 之結果推斷，此引子對除可應用於 ORSV 之偵測外，亦可

供本省瓜類作物 CGMMV 之偵測。尤其部分瓜類如扁蒲及冬瓜之種子均有 CGMMV 帶毒傳播之情形 (4)，此引子對將來也許可應用在瓜類種子帶毒偵測上，其敏感度應可高於傳統之免疫偵測法。不過，依本試驗結果尚未能完全掌握此引子對在實際應用時之穩定性與對不同來源分離株之反應性，因此，其未來之發展及實用化，仍有賴進一步之測試方能達成。綜合所述，本試驗所發展之 RT-PCR 反應程序已具有搭配傳統免疫抗體偵測法，進行蘭花病毒 ORSV 檢定之可行性，我們對於此技術之敏感度深具信心，但發展過程中也發現由於其高度之敏感性，操作過程須極端小心，否則試料間之不慎污染，會造成結果之誤判，此現象在過去報告中早有相同之闡述 (5, 10)，因此適當增加試料之重複數與提升人員之操作品質，乃未來此技術實際應用於產業上之必要考量。另外 RT-PCR 之試料製備程序遠較傳統之免疫偵測法繁瑣，此亦可能影響產業界應用之意願 (5)，未來技術發展上應針對此缺點加以改進，提升 RT-PCR 檢定流程之效率，以符合產業應用之需求。

謝 辭

本研究承農委會科技計畫 (85-科技-1.1-糧-49) 經費補助，謹此致謝。研究過程中蒙台大蘭園賴本智先生，清波蘭園陳榮興先生，台糖公司陳文輝博士，埔里張文賢先生等各方先進提供各種蘭花作為試驗材料，使本研究得以完成階段性成果，在此一併表達衷心謝忱。

引用文獻

1. 張清安. 1991. 蘭花病毒病害. 張清安編著. 行政院農業委員會及台灣省政農林廳補助出版. 台中. 台灣. 40pp.
2. 張清安. 1994. 台灣花卉病毒病害. p.213-224. 台灣花卉病蟲害研討會專刊. 中華植物保護學會特刊新二號. 277pp.
3. 曾雅詩、陳金枝、張清安. 1995. 應用反轉錄聚合酶連鎖反應及核酸探針法偵測齒舌蘭輪斑病毒. 植物病理學會刊 4:198.
4. 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與分佈. 植物保護學會刊 29:233-244.
5. Barry, K., Hu, J. S., Kuehnle, A. R., Sughii, N. 1996. Sequence analysis and detection using immunocapture-PCR of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in Hawaiian orchids. J. Phytopathology 144:179-186.
6. Chang, C. A., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. 1988. Characterization and immunological analysis of nuclear

- inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyviruses. *Phytopathology* 78:1266-1275.
7. Chang, C. A., and Pang, J. H. 1990. Preparation of antisera against cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus and their uses in serological indexing for orchid industry in Taiwan. *Plant Prot. Bul.* 32:336.
 8. Dubs, M. C., and Van Regenmortel, M. H. V. 1990. Odontoglossum ringspot virus coat protein: sequence and antigenic comparisons with other tobamoviruses. *Arch.Virol.* 115:239-249.
 9. Edwardson J. R., and Zettler, F. W. 1988. Odontoglossum ringspot virus. p.233-247. In: *The plant viruses*. Vol. 2. Van Regenmortel, M.H.V., and Fraenkel-Conrat, H. (eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, USA.
 10. Hadidi, A., Levy, L., Podleckis, E. V. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. p.167-187. In: *Molecular methods in plant pathology*. Singh, R. P., and Singh, U. S. (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL.
 11. Hollings, M., and Stone, O. M. 1977. Cymbidium ringspot virus. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 178.
 12. Hsu, H. T., Vongsasitorn, D., and Lawson, R. H. 1992. An improved method for serological detection of cymbidium mosaic potyvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82:491-495.
 13. Hu, J. S., Ferreira, D., Wang, M., and Xu, M. Q. 1993. Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. *Plant Dis.* 77:464-468.
 14. Hull, R. 1993. Nucleic acid hybridization procedures. p. 253-271. In: *Diagnosis of plant virus diseases*. Matthews, R. E. F. (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL.
 15. Isomura, Y., Matumoto, Y., Murayama, A., Chatani, M., Inouye, N., and Ikegami, M. 1991. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the odontoglossum ringspot virus coat protein gene. *J. Gen. Virol.* 72:2247-2249.
 16. Lawson, R. G., and Hsu, H. T. 1995. Orchid viruses. p. 409-420. In: *Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops*. Loebenstein, G. *et. al.* (eds.), John Wiley & sons, West sussex, United Kingdom.
 17. Lim, S. T., Wong, S. M., Yeong, C. Y., Lee, S. C., Goh, C. J. 1993. Rapid detection of cymbidium mosaic virus by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Methods* 41:37-46.
 18. Paul, H. L. 1975. Odontoglossum ringspot virus. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 155.
 19. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 20. Srifah, P., Loprasert, S., Rungroj, N. 1996. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction for cloning of coat protein-encoding genes of cymbidium mosaic virus. *Gene* 179:105-107.
 21. Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., and Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74:621-625.

ABSTRACT

Chang, C. A.^{1,2}, Tseng, Y. S.¹, Chen, C. C.¹, and Deng, T. C.¹ 1999. Detection of odontoglossum ringspot tobamovirus by DNA probe hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Pathol. Bull.* 8:29-36. (¹ Dept. of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute ; ² Corresponding author, E-mail: cachang@wufeng.tari.gov.tw , Fax No: 04-3331089)

Orchids are currently one of the most popular ornamental crops in the world market. There have been at least 25 different viruses documented to infect orchids, however, among them odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) and cybidium mosaic potexvirus (CyMV), are considered economically important to the orchid cultivation industry. Traditionally, ORSV is detected by serological methods, with a sensitivity generally acceptable. However, recent information indicates that some ORSV-infected orchid seedlings derived from tissue culture escape from ELISA indexing, indicating the need of developing more sensitive detection techniques, especially for tissue culture orchids. In the course of this study, we designed a primer pair (OS-1/OS-4) based on the known nucleotide sequence of ORSV coat protein gene, which could specifically amplify ORSV RNA into a 372-bp DNA product in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). OS-4 (5'- TCTTATTGCTACAGTTGC-3') was used as anti-viral sense primer, while OS-1 (5'- TCTTACTATTACAGAC-3') was the viral sense one. The optimum reaction conditions for each cycle of PCR were denaturation at 95 C for 1 min, annealing at 50 C for 1 min and elongation at 72 C for 2 min and 26 cycles were generally used. Five different orchid species commonly grown in Taiwan were tested by RT-PCR and satisfactory results were consistently obtained. We also cloned the PCR product amplified from ORSV RNA into pUC18 plasmid and obtained a non-isotopic DIG-labeled DNA probe for dot-blot hybridization test. The DNA probe specifically hybridized with various ORSV-infected orchids but not with healthy controls and two other tobamoviruses, tobacco mosaic tobamovirus (TMV) and cucumber green mottle mosaic tobamovirus (CGMMV). In comparing the sensitivity of ORSV detection in crude orchid sap, we found that RT-PCR was the most sensitive one which could detect ORSV in a concentration 10^7 times lower than that detectable by ELISA, and 10^3 times lower than that detectable by probe hybridization. Besides, a similar size DNA product could also be amplified from the RNA template of CGMMV but not from TMV RNA by OS-1/OS-4 primers in RT-PCR. The possible application of the OS-1/OS-4 primer pair in detecting CGMMV by RT-PCR is discussed.

Key words: ORSV, RT-PCR, probe hybridization, virus detection, orchid virus