

感染洋桔梗之蕪菁嵌紋病毒之鑑定

趙佳鴻¹ 陳慶忠¹ 張清安^{2,3} 陳金枝²

1. 彰化縣大村鄉 行政院農業委員會台中區農業改良場
 2. 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所
 3. 聯絡作者：電子郵件 CACHang@wufeng.tari.gov.tw；傳真 04-3338162
- 接受日期：中華民國 89 年 9 月 15 日

摘要

趙佳鴻、陳慶忠、張清安、陳金枝. 2000. 感染洋桔梗之蕪菁嵌紋病毒之鑑定. 植病會刊 9:115-122.

1997 年春季於南投及屏東萬丹、鹽埔等地栽培之洋桔梗發現部份植株矮化、葉片產生黃化圓斑點疑似病毒病害病徵，由罹病植株上分離得到一種長絲狀病毒，大小約 775 x 13 nm，經在奎藜 3 次單斑分離後，回接至健康洋桔梗苗，產生與田間罹病株相同之病徵。所分離之病毒以機械接種方式可感染十字花科之蘿蔔、甘藍、花椰菜之葉片出現系統性黃綠相間嵌紋病徵，於紅藜、奎藜、白莧、紅莧、雞冠花、菜豆及數種煙草則是產生黃褐色壞疽單斑。此病毒可經由桃蚜以非永續型方式傳播。以電子顯微鏡觀察罹病組織之超薄切片，可見薄層狀及卷軸狀等圓柱狀內含體散佈於細胞質內。罹病葉片粗汁液經 PEG 沉澱及氯化銻等密度離心後可得純化之病毒顆粒。利用 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析純化病毒，顯示其具有單一鞘蛋白基本單位 (coat protein subunit)，分子量約為 37 kDa。以對應蕪菁嵌紋病毒 (turnip mosaic virus) 蘿蔔分離株之抗血清和本研究所分離之洋桔梗病毒株進行血清類緣測定，在 SDS- 雙向免疫擴反應 (SDS-immunodiffusion)、間接酵素連結免疫分析 (Indirect ELISA) 及西方轉漬反應 (western blotting) 等試驗中均顯示二者具不可區分之血清類緣關係。綜合上述試驗結果確定造成洋桔梗系統性斑點病徵之病毒應屬蕪菁嵌紋病毒之分離株 (簡稱 TuMV-L)，此乃證實 TuMV 可以感染洋桔梗之首次報導。

關鍵詞：洋桔梗、蕪菁嵌紋病毒

緒言

洋桔梗 (*Eustoma russellianum* (Don.) Griseb) 原產於美國中部內布拉斯加州 (Nebraska) 至德克薩斯州 (Texas) 一帶，屬龍膽科的草本植物⁽¹⁾。台灣在 1968 年由日本引入於中部地區零星試栽，是近年來發展快速的新興切花之一，其花形優美，花色有紫、白、黃、粉紅及白底鑲紫邊、粉邊等多種，清新嬌媚，且切花吸水性好，瓶插壽命長，頗受消費者歡迎⁽²⁾。近年來，因國內市場的需求，加上栽培技術的改進，生產地區除中部的埔里、后里、田尾、永靖外，嘉義縣新港及屏東萬丹、鹽埔等地亦有栽培⁽²⁾。國外有關危害洋桔梗之病毒，經紀錄者至少 9 種，即菜豆黃化嵌紋病毒 (bean yellow mosaic virus, BYMV)^(16,21)、蠶豆萎凋病毒 (broad bean wilt virus, BBWV)⁽²⁰⁾、胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic virus, CMV)^(16,20,27)、洋桔梗壞疽病毒 (*lisianthus necrotic virus*, LNV)^(19,20)、洋桔梗條紋病毒 (*lisianthus line pattern virus*, LLPV)⁽²³⁾、菸草嵌紋病

毒 (tobacco mosaic virus, TMV)⁽¹⁶⁾、番茄嵌紋病毒 (tomato mosaic virus, ToMV)⁽²²⁾、番茄斑萎病毒 (tomato spotted wilt virus, TSWV)⁽²⁴⁾ 及洋桔梗捲葉病毒 (*lisianthus leaf curl virus*)⁽¹²⁾ 等，台灣已紀錄之種類包括 BYMV⁽⁹⁾、LNV⁽¹⁰⁾、BBWV⁽⁵⁾ 及 CMV⁽³⁾。筆者等於 1997 年春季於南投及屏東萬丹、鹽埔等地栽培之洋桔梗發現其中部份植株矮化、葉片產生黃化圓斑點疑似病毒病害病徵，初步血清學試驗顯示與蕪菁嵌紋病毒 (turnip mosaic virus, TuMV) 有血清類緣關係⁽⁸⁾。本文就此新分離之病毒 (暫稱為 TuMV-L) 的性質、電子顯微鏡觀察、血清學特性等試驗結果提出報告，供擬定防治策略之參考。

材料與方法

病毒分離與供試材料之準備

1997 年春季自南投及屏東萬丹、鹽埔等地採集之黃

化、輪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磨擦接種於撒有 400 目金剛砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 葉片，切取單斑磨汁後，接種於奎藜，經三次單斑分離後，回接於蘿蔔或芥菜，所得純系分離株 (TuMV-L) 做為本試驗接種源，另外取部份材料以 50% 甘油保存於 -40 備用。

寄主範圍測定

取 TuMV-L 接種至蘿蔔初發病之葉片作為接種源，依前述方法接種 莧科 (Amaranthaceae)、藜科 (Chenopodiaceae)、十字花科 (Cruciferae)、葫蘆科 (Cucurbitaceae)、龍膽科 (Gentianaceae)、豆科 (Leguminosae) 及茄科 (Solanaceae) 等 7 科 23 種植物 (表一)，於溫室下連續觀察四週。

電子顯微鏡觀察

進行陰染法觀察病毒顆粒型態時乃依據 Christie et al. (11) 之方法，將 3×3 mm 大小之病組織以 3-5 滴之 0.1 M 磷酸緩衝液切碎再以銅網吸附其汁液，或吸附純化之病毒懸浮液，經 2% 醋酸鈷染色後以電子顯微鏡 (JOEL JEM-200 CX)，在 80 kV 下觀察。觀察罹病組織內細胞學變化時乃以過去所報告之超薄切片法行之 (10)。

蚜蟲傳播試驗

選擇偽菜蚜 (*Lipaphis erysimi* Kaltentbach)、棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 及桃蚜 (*Myzus persicae* Sulzer) 等三種作為供試蚜蟲，經室內繁殖三代後視為不帶毒蟲。進行傳播試驗時將供試蟲先行飢餓處理 2 小時，移至接種 TuMV-L 確定發病之芥菜葉片上以接種夾固定吸毒 2 小時，再將 1 隻或 5 隻蚜蟲移置健康芥菜上取食，24 小時後挑去蚜蟲並噴佈 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 4 週 (7)。

病毒之純化

將 TuMV-L 機械接種於芥菜及蘿蔔實生苗上，培養於玻璃溫控室內 (28±2)，經 14-21 天後採收病葉，依 Gonsalves and Ishii (17) 之方法並略經修改後純化病毒。新鮮病葉，每克加 2 ml 0.5 M PE (pH 7.5) 萃取緩衝溶液，經打碎過濾後，加入氯仿及四氯化碳 (各 0.5 ml/g) 淨化處理，低速離心去除綠色殘渣。上澄液加入 8% PEG6000，於 4

下攪拌後，低速離心取其沉澱物以 0.1 M PE (pH 7.0) 緩衝液懸浮，再經低速離心，去除綠色殘渣。其上澄液加入

表一、蕪菁嵌紋病毒洋桔梗分離株於供試植物上之病徵及反應

Table 1. Host reactions and symptoms of lisianthus isolate of turnip mosaic virus on test plants

| Test plant | Reactions ¹ | |
|--|------------------------|-----------------|
| | Inoculated leaves | Systemic leaves |
| Amaranthaceae (莧科) | | |
| <i>A. mangostanus</i> (白莧) | LL | - |
| <i>A. mangostanus</i> from rubeer (紅莧) | LL | - |
| <i>Celosia argentea</i> (雞冠花) | LL | - |
| Chenopodiaceae (藜科) | | |
| <i>Chenopodium amaranticolor</i> (紅藜) | LL | - |
| <i>C. quinoa</i> (奎藜) | LL | - |
| Cruciferae (十字花科) | | |
| <i>Brassica juncea</i> (芥菜) | M, CR | M, CR |
| <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (甘藍) | M, CR | M, CR |
| <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (花椰菜) | M, CR | M, CR |
| <i>Raphanus sativas</i> (蘿蔔) | M, CR | M, CR |
| Cucurbitaceae (葫蘆科) | | |
| <i>Cucumis melo</i> (洋香瓜) | - | - |
| <i>Cucurbita pepo</i> cv. <i>field pumpkin</i> (矮南瓜) | - | - |
| <i>Benincasa hispida</i> (冬瓜) | - | - |
| <i>Luffa cylindrica</i> (絲瓜) | - | - |
| Gentianaceae (龍膽科) | | |
| <i>Lisianthus russellianus</i> (洋桔梗) | CS | CS, NS |
| Leguminosae (豆科) | | |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> (菜豆) | LL | - |
| <i>P. angularis</i> (紅豆) | - | - |
| <i>Vinga unguiculata</i> (豇豆) | - | - |
| Solanaceae (茄科) | | |
| <i>Capsicum annum</i> red pepper (辣椒) | - | - |
| <i>Annum</i> var. <i>grossum</i> seudt (甜椒) | - | - |
| <i>Lycopersicum esculentum</i> (番茄) | - | - |
| <i>N. tabacum</i> cv. <i>white burley</i> (煙草) | LL, C | - |
| <i>N. tabacum</i> var. <i>vam-hicks</i> (萬國土) | LL | - |

¹. Abbreviation of symptoms: chlorosis (C), chlorotic spot (CS), necrotic spot (NS), crinkle (CR), local lesion (LL), mosaic (M), no symptom (-)

8% PEG 及 0.3 M NaCl 攪拌後，經低速離心後，沉澱物以 0.1 M PE 緩衝溶液充分懸浮，然後加入 15% (W/V) 氯化銫 (CsCl)，溶解後取此溶液 9 ml 加至下層墊有 3 ml 含有 53% (W/V) 氯化銫之 PE 緩衝溶液中，離心 16 小時後，吸取綿密狀之病毒層，加入 8% PEG 及 0.3 M NaCl 攪拌，低速離心後所得純化之病毒以 0.01 M PEN 緩衝溶液 (pH 7.0) 懸浮並以光譜儀 (Hitachi UV-2000 spectrophotometer) 於波長 320 nm 至 200 nm 自動掃描，繪出吸收曲線，並依 260 nm 波長的吸收光度計算病毒濃度。

病毒外鞘蛋白分子量測定

TuMV-L 病毒外鞘蛋白分子量測定以 SDS-PAGE 法行之。分子量之決定以 Pharmacia Biotechnology Company 之 SDS-molecular weight marker，分別含 phosphorylase b (94K)，bovine serum albumin (67K)，ovalbumin (43K)，carbonic anhydrase (30K)，soybean trypsin inhibitor (20K)，及 α -lactalbumin (14K) 做為標記蛋白進行估算。

間接酵素連結免疫分析

罹病組織以 coating buffer 研磨，並經 10 倍系列稀釋於微量盤之孔穴中，靜置後以 PBST 水洗，再加入以 conjugate buffer 稀釋 1000 倍之 菜豆黃化嵌紋病毒 (BYMV)、蕪菁嵌紋病毒蘿蔔分離株 (TuMV-R)、百合斑紋病毒 (LiMV)⁽⁶⁾ 及芋頭嵌紋病毒 (DMV) 等四種絲狀病毒之免疫球蛋白 (IgG)，靜置後再以 PBST 水洗，加入稀釋 5000 倍之 goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Jackson)，靜置及 PBST 水洗後，加入酵素基質溶液 (p-nitrophenyl phosphate disodium, Sigma, 1 mg/ml) 反應 20 分鐘後，以 NaOH 停止反應，再以 ELISA 測讀儀 (Bio-Tek Instruments, Burlington, VT, USA) 測讀波長 405 nm 之吸光值。

SDS-雙向免疫擴散反應

SDS-雙向免疫擴散反應 (SDS-immunodiffusion) 所使用之抗血清包括 TuMV-L 及 TuMV-R 蘿蔔分離株，供試之抗原包括接種 TuMV-L 之洋桔梗及芥菜，另以接種 TuMV-R 之蘿蔔做為正反應對照抗原，未接種之洋桔梗及蘿蔔葉片則作為健康對照。

結 果

病徵與寄主反應

田間洋桔梗病株主要在葉片出現系統性黃化圓輪斑，發病初期葉片呈黃化圓形輪斑，周圍則呈模糊黃化現象 (圖一、A)，後期病斑整個轉為壞疽白色圓輪斑，斑點周圍呈水浸狀 (圖一、B)。罹病植株葉片較黃，變小，全株矮化。將病葉機械接種於奎藜，7-10 天後可見葉片產生許多黃色的局部病斑，直徑約為 1.3 mm，病斑中央部份有輕微的壞疽，約 15 天後病斑周圍出現黃色暈環。將此斑點單獨切下，磨碎後再接種於奎藜，如此重複三次單斑篩選分離，將最後一代之單斑回接至洋桔梗實生苗上，其葉片出現與田間罹病株相似的黃化、圓斑及矮化等病徵 (圖一、C)，證明所分離之病毒確為造成田間洋桔梗葉片系統性斑點病徵之致病病毒。

將 TuMV-L 機械接種於 7 科 23 種植物，其中十字花

科之蘿蔔、甘藍、花椰菜、芥菜之葉片出現系統性黃綠相間嵌紋病徵 (圖一、D)，龍膽科之洋桔梗葉片產生系統性圓狀斑點。紅藜、奎藜、白莧、紅莧、雞冠花、菜豆及三種煙草則產生黃褐色壞疽單斑。其餘的供試植物呈非寄主反應 (表一)。

電子顯微鏡觀察

利用陰染法觀察接種 TuMV-L 之奎藜或蘿蔔葉片及純化後之病毒試料，均可發現型態為長絲狀，大小約 775 x 13 nm 之病毒顆粒，與馬鈴薯 Y 屬 (Potyvirus) 病毒之特性相似 (圖二、A、C)。同法觀察健康洋桔梗植株及非寄主之供試植物，則無任何類似之病毒顆粒存在。觀察感染 TuMV-L 之洋桔梗、蘿蔔及芥菜之病組織超薄切片，於細胞質中發現有 potyviruses 特有的風車狀內含體 (pinwheel inclusions)，另外也發現薄層狀 (laminated aggregates) 及捲軸狀 (scrolls) 內含體 (圖二、D)。

蚜蟲傳播試驗

1999 年 6-9 月間將取食 TuMV-L 芥菜病葉 2 小時後之偽菜蚜、棉蚜及桃蚜分別以 1 及 5 隻接種於健康芥菜植株上，結果以 1 或 5 隻桃蚜進行傳播之 15 及 25 健康芥菜植株中分別有 1 及 14 株發病，而其餘 2 種蚜蟲則無傳播現象 (表二)。

病毒之純化

接種 TuMV-L 之蘿蔔及芥菜經上述純化步驟及氯化鈉平衡離心後，在離心管距離液面 5.5, 6 及 6.5 公分處分別出現白色，綠色和乳白色的環帶。若取健康葉片以同法純

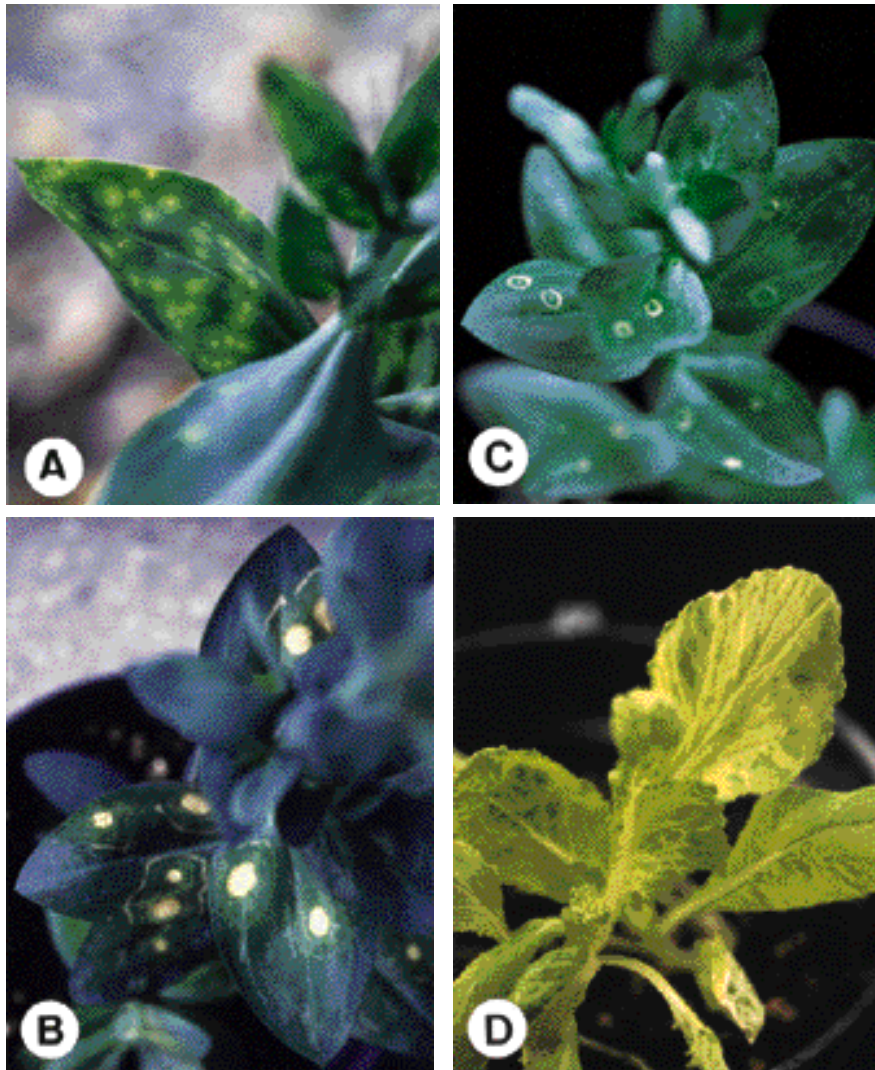
表二、三種蚜蟲傳播洋桔梗蕪菁嵌紋病毒試驗

Table 2. Transmission test of lisanthus isolate of turnip mosaic virus by three different aphid species¹

| Aphid species | No. aphids for inoculation | | |
|-------------------------|----------------------------|-------|-------|
| | 1 | 5 | Total |
| <i>Lipaphis erysimi</i> | 0/10 ² | 0/20 | 0/30 |
| <i>Aphis gossypii</i> | 0/10 | 0/20 | 0/30 |
| <i>Myzus persicae</i> | 1/15 | 14/25 | 15/40 |

¹ Aphids were fasting for 2 hr before acquisition feeding. Mustards inoculated with TuMV-L were used as virus source plants for acquisition feeding. Aphids were allowing feeding on mustards for 2 hr before they were transferred to healthy mustards for inoculation. Twenty four hr after inoculation the test plants were sprayed with bifenthrin and kept in greenhouse for a period of one month for observation.

² No. of plants infected/no. of plants inoculated by aphids.



圖一、蕪菁嵌紋病毒洋桔梗分離株 (TuMV-L) 在不同寄主上之病徵。(A) 田間洋桔梗植株被感染初期之病徵；(B) 被感染植株後期產生壞疽斑點之病徵；(C) 經單斑篩選之 TuMV-L 接種於洋桔梗上產生系統性斑點病徵；(D) 蕪菁嵌紋病毒洋桔梗分離株接種於芥菜上所產生之嵌紋病徵。

Fig. 1. Photographs showing symptoms induced by lisianthus isolate of turnip mosaic virus (TuMV-L). (A) A field grown lisianthus plant exhibiting yellow spotting symptoms infected by TuMV-L; (B) Necrotic spotting symptoms of the same plant as in A. developed at later stage; (C) Yellow spots and stunting symptoms on healthy lisianthus plant inoculated with TuMV-L; (D) Systemic mosaic symptom on mustard inoculated with TuMV-L.

化，則在 6.5 公分處未出現乳白色環帶，因此推測此乳白色環帶可能為濃縮之病毒顆粒。將此乳白色環帶之懸浮液抽取濃縮後以電顯觀察，確定其為純化之病毒顆粒（圖二、B），純化之試料經光電比色計掃描，在波長 260 nm 處有一吸收高峰； $A_{260/280}$ 之比值約為 1.26。估計每一百克芥菜之純化病毒收量約 5-6 mg，而蘿蔔則約 2-3 mg。

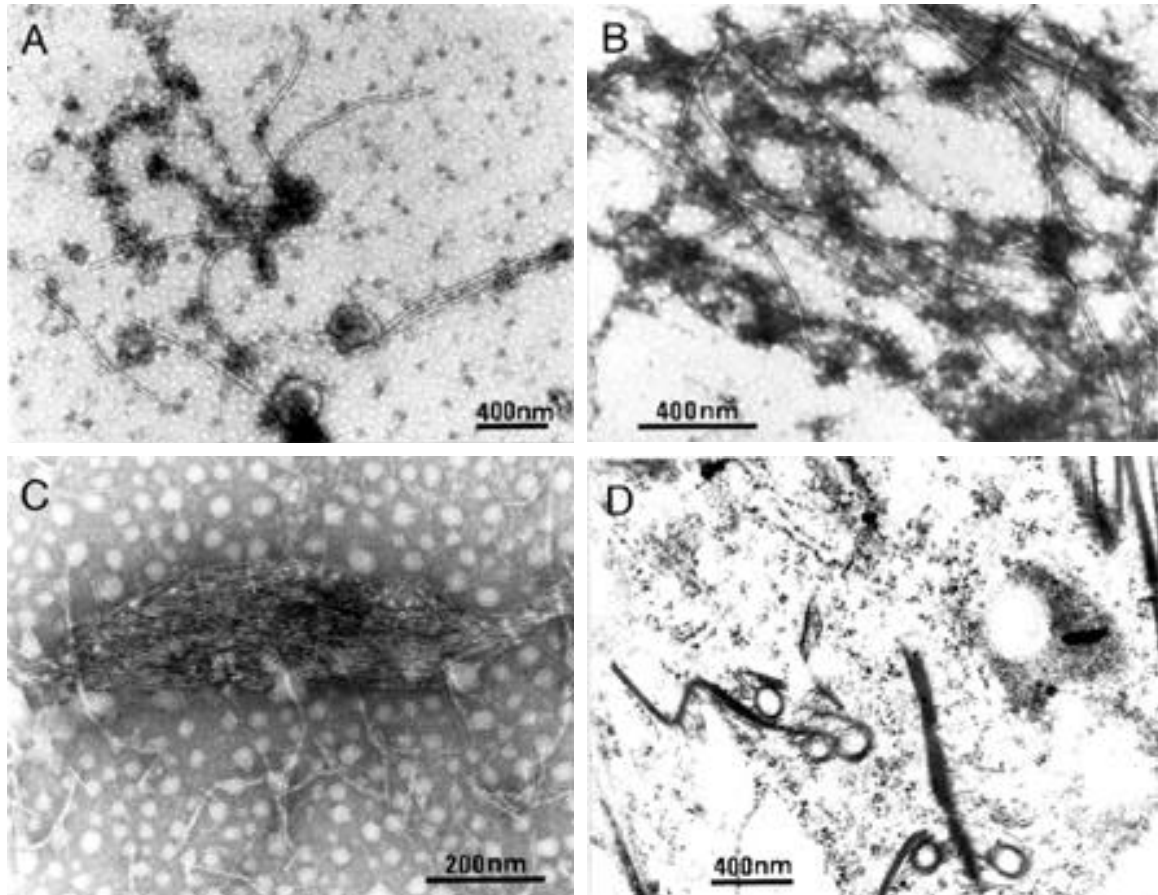
病毒鞘蛋白分子量之測定

以 SDS 解離純化之 TuMV-L 病毒顆粒，經 10%

polyacrylamide 膠體電泳分析，並與標記蛋白比對，計算其相對分子量約為 37 kDa，而健康之洋桔梗植株則無此 37 kDa 蛋白（圖三）。

血清學關係測定

由於前述試驗結果一再顯示 TuMV-L 可能屬於 potyviruses 病毒，因此本試驗以四種台灣花卉上常見之 potyviruses (BYMV、DMV、LiMV 及 TuMV-R) 之免疫球蛋白 (IgG) 與 TuMV-L 進行間接式酵素連結免疫反應 (Indirect ELISA)，結果顯示洋桔梗病毒分離株 TuMV-L 僅



圖二、利用電子顯微鏡觀察蕪菁嵌紋病毒洋桔梗分離株 (TuMV-L) 之顆粒型態及感染後之寄主細胞學變化。(A) 陰染法觀察感病組織內之 TuMV-L 顆粒型態；(B) 純化後之 TuMV-L 顆粒型態；(C) 純化後之 TuMV-L 顆粒凝集成束狀；(D) 罹病組織超薄切片下所觀察之內含體型態，LA 為薄層狀 (laminated aggregates) 内含體，S 為卷軸狀 (scrolls) 内含體。

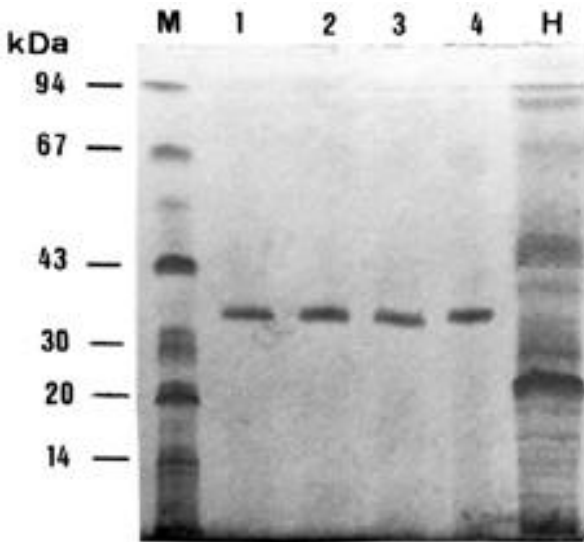
Fig. 2. Electron micrographs showing particle and inclusion morphology of lisianthus isolate of turnip mosaic virus (TuMV-L). (A) Negative stained virus particles observed from leaf dips; (B) Virus particles observed in purified preparation; (C) Highly aggregated virus particles after purification; (D) Laminated aggregate (LA) and scroll (S) inclusions observed in ultra-thin sectioned infected tissue.

與 TuMV-R 之 IgG 產生強烈反應，當抗原稀釋達 1000 倍時，二者間之 EIA 反應值高達 1.2，而同樣條件下 TuMV-L 與 BYMV、DMV 及 LiMV 之抗體間 EIA 反應值均低於 0.3。為證實 TuMV-L 與 TuMV 具有極為接近之血清類緣關係，我們進一步應用 SDS-immunodiffusion test 進行比對，發現不管以本研究所製備對應 TuMV-L 之抗血清或以蘿蔔分離株 TuMV-R 之抗血清反應結果，TuMV-L 與 TuMV-R 二種抗原間無法測出叉狀反應 (spur reaction) (圖四)；再度印證二者為血清類緣關係幾近相同之病毒。

討 論

本研究經由病毒生物特性 (biological properties)、顆粒型態、細胞學變化、鞘蛋白構造及血清學等試驗證明 1997 年由南投等地栽培之洋桔梗上所發現之葉片系統性

黃化斑點病徵乃由屬於馬鈴薯 Y 屬 (Potyvirus) 之蕪菁嵌紋病毒 (TuMV) 所引起⁽⁴⁾。相較於其他 potyviruses，TuMV 之寄主範圍較為廣泛，可感染包括十字花科 (Cruciferae)、錦葵科 (Malvaceae)、豆科 (Leguminosae) 及茄科 (Solanaceae) 等 43 科 156 屬 318 種植物⁽¹⁴⁾，而洋桔梗屬龍膽科，以往並無被 TuMV 感染之記錄，本研究結果首次證實 TuMV 可以感染洋桔梗並影響其生長與外觀。洋桔梗為近年來發展快速的新興切花作物，國內已記錄之洋桔梗病毒包括 BYMV、LNV、BBWV 及 CMV 等四種，因此 TuMV 成為除 BYMV 外，第二種可以危害洋桔梗之 potyviruses，由於 potyviruses 在田間乃藉由蚜蟲以非永續型方式傳播，而本研究亦證實洋桔梗分離株 TuMV-L 具有此項特性，故可提供栽培農友防治此病毒蔓延之參考。根據文獻紀錄可媒介 TuMV 之蚜蟲種類包括桃蚜、菜蚜 (*Brevicoryne brassicae* Linnaeus)、偽菜蚜及棉蚜等 29 屬 89 種⁽¹⁵⁾。本研究蚜蟲傳播試驗結果僅證實桃



圖三、應用 SDS 電泳分析純化之蕪菁嵌紋病毒洋桔梗分離株 (TuMV-L) 鞘蛋白基本單位。M 行乃標準對照蛋白，行 1~4 為不同次純化之 TuMV-L 鞘蛋白，H 行為健康洋桔梗經由病毒純化流程所得蛋白試料。

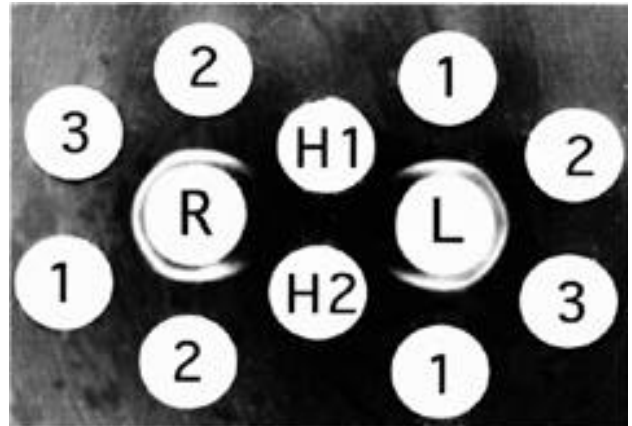
Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analyses of purified coat protein of lisanthus isolate of turnip mosaic virus (TuMV-L). Lane M, standard protein markers; Lane 1-4, purified coat protein of TuMV-L from different preparations; Lane H, protein preparation from healthy lisanthus tissue processed by the same procedure as virus purification.

蚜可傳播 TuMV-L，而棉蚜及偽菜蚜則不具傳播能力，此結果與國外文獻記載有所出入。基於影響蚜蟲傳播之因素頗多^(13,25,28)，因此棉蚜及偽菜蚜無法傳播 TuMV-L 之原因尚需進一步探討。

以往文獻上對於 TuMV 之瞭解主要在於其乃危害十字花科作物最普遍之病毒，過去學者曾依其十字花科寄主範圍與反應之差異將 TuMV 區分為 C1, C2, C3 及 C4 等病毒系統⁽²⁶⁾，本省之資料顯示除上述 4 種系統外，另有一新系統 C5 存在⁽¹⁸⁾，至於本研究由洋桔梗所分離之 TuMV-L 係屬何種系統，由本研究結果並未能得知，需進一步試驗方能澄清。

引用文獻

1. 成澤久. 1990. 高冷地洋桔梗. p.199-202. 切花栽培技術 (一、二年生草花). 李觀明譯. 淑馨出版社. 台北. 316pp.
2. 黃達雄. 1995. 洋桔梗. p.569-574. 台灣農業要覽農作篇 (二). 豐年社. 台北. 698pp.
3. 陳慶忠、胡仲祺. 1999. 洋桔梗上胡瓜嵌紋病毒之分離及鑑定. 植保會刊 41:179-198.
4. 陳翠妙、陳煜焜、陳脈紀、葉錫東. 1999. 引起茼蒿白



圖四、應用免疫擴散反應 (SDS-immunodiffusion) 分析蕪菁嵌紋病毒洋桔梗分離株 (TuMV-L) 與蘿蔔分離株 (TuMV-R) 間之血親類緣關係。中間二穴分別添加 TuMV-L (L) 及 TuMV-R (R) 之抗血清。周圍各穴則加入經 SDS 處理之感染 TuMV-L 之蘿蔔抗原 (1)，感染 TuMV-R 之蘿蔔抗原 (2)，感染 TuMV-L 之洋桔梗抗原 (3)，健康洋桔梗抗原 (H1) 及健康蘿蔔抗原 (H2)。

Fig. 4. Serological relationships between lisanthus (-L) and radish (-R) isolates of turnip mosaic virus (TuMV) as determined by SDS-immunodiffusion test. The central wells were filled with antisera against TuMV-L (L) and TuMV-R (R). The peripheral wells were applied with SDS treated antigens of TuMV-L infected radish (1) and lisanthus (3) and TuMV-R infected radish (2). H1 and H2 were healthy control antigen of lisanthus and radish, respectively.

化嵌紋病之蕪菁嵌紋病毒分離株之寄主反應、細胞學特性及血清學性狀. 植病會刊 8:73-82.

5. 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. (摘要)
6. 張清安、陳金枝、鄧汀欽、蔡惠婷. 1996. 百合斑紋病毒之血清學性質與鑑定技術研究. 植病會刊 5(4):222. (摘要)
7. 趙佳鴻、陳慶忠、黃秋雄. 1994. 瓜類兩種馬鈴薯 Y 群病毒之傳播與生態學研究. 植保會刊 3:84-90.
8. 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 7:223. (摘要)
9. Chang, C. A. and Tsai, H. T. 1993. Isolation of bean yellow mosaic virus from Lisanthus developing foliar mosaic and flower breaking symptoms. Plant Pathol. Bull. 2:250-251.
10. Chen, C. C., Chen, Y. K. and Hsu, H. T. 2000. Characterization of a virus infecting lisanthus. Plant Dis. 84:506-509.
11. Christie, S. R., Purcifull, D. E., Crawford, W. E. and Ahmed N. A. 1987. Electron Microscopy of Negatively Stained Clarified Viral Concentrates Obtained from Small Tissue Samples with Appendices on Negative Staining

- Techniques. Fla. Agric. Exp. Sta. Bull. No. 872. 45pp.
12. Cohen, J., Gera, A., Ecker, R., Ben Joseph, R., Perlman, M., Gokkes, M., Lachman, O. and Antignus, Y. 1995. Lisianthus leaf curl a new disease of Lisianthus caused by tomato yellow leaf curl virus. *Plant Dis.* 79:416-420.
 13. Eastop, V. F. 1977. World importance of aphids as virus vectors. P.1-61. in: *Aphid as Virus Vectors.* (Harris, K. F. and K. Maramorosch (ed.)) Academic Press, New York.
 14. Edwardson, J. R. 1974. Host ranges of viruses in the PVY-group. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Gainesville. 225pp.
 15. Edwardson, J. R. and Christie, R. G. 1991. The Potyvirus Group. Vol. IV. Fla. Agric. Exp. Stn. Mon. 16.
 16. Gera, A. G. and Cohen, J. 1990. The natural occurrence of bean yellow mosaic, cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in Lisianthus in Israel. *Plant Pathol.* 39:561-564.
 17. Gonsalves, d., and Ishii, M. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 70:1027-1032.
 18. Green, S. K. and Deng, T. C. 1982. Investigations on the occurrence of TuMV strain on the cruciferous vegetables in Taiwan and the possible detection of a new strain of TuMV. *Plant. Pro. Bull. ROC.* 24:286-287. (Abstr.)
 19. Iwaki, M., Hanada, K., Maria, E.R.A., Onogi, S. 1987. Lisianthus necrosis virus, a new necrovirus from *Eustoma russellianum*. *Phytopathology* 77 (6):867-870.
 20. Iwaki, M., Maria, E. R. A., Hanada, K., Onogi, S. and Zenbayashi, R. 1985. Three viruses occurred in lisianthus plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 52:355.
 21. Lisa, V., and Dellavalle, G. 1987. Bean yellow mosaic virus in *Lisianthus russellianus*. *Plant Pathol.* 36:214-215.
 22. Lisa, V. and Dellavalle, G. 1989. Malattie da virus del lisianthus. *Atti Giorn. Studio. S. O. I. Sul lisianthus, Saremo, Italy* 1989:85-88.
 23. Lisa, V., Vaira, A. M., d' Aquilio, M., Dellavalle, G., Masenga, V., Milne, R. G. and Boccoardo, G. 1994. Characterization of an Ilarvirus from Lisianthus(*Eustoma Grandiflorum*). *Acta. Hortic.* 377:81-89.
 24. Lisa, V., Vaira, A. M., Milne, R. G., Luisoni, E. and Rapetti, S. 1990. Tomato spotted wilt virus in five crops in Liguria. *Inform. Fitopatol.* 40:34-41.
 25. Mossop, D. W. and Francki, R. I. B. 1977. Association of RNA3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus . *Virology* 81:171-181.
 26. Provvidenti, R. 1980. Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 105:571-573.
 27. Provvidenti, R. 1985. Two newly recognized hosts of cucumber mosaic virus: *Eustoma grandiflorum* and *Peristrophe angustifolia*. *Plant Dis.* 69:542.
 28. Wang, R. Y., and Pirone, T. P. 1999. Purification and characterization of turnip mosaic virus helper component protein. *Phytopathology* 89:564-567.

ABSTRACT

Chao, C. H.¹, Chen, C. C.¹, Chang, C. A.^{2,3} and Chen, C. C.² 2000. Identification of a turnip mosaic virus isolate causing systemic yellow spotting on Lisianthus. *Plant Pathol. Bull.* 9:115-122. (¹ Taichung District Agricultural Improvement Station, Tatsuan, Changhua, Taiwan ; ² Dept. of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng413, Taichung, Taiwan ; ³ Corresponding author, E-mail: CACHang@wufeng.tari.gov.tw, Fax No: 04-3338162)

A disease of Lisianthus (*Eustoma russellianum* (Don.) Griseb) showing systemic yellow spotting and stunting was found in the central and southern part of Taiwan. Filamentous virus particles about 775 x 13 nm in size were consistently observed from the infected tissue and subsequently proved to be the causal agent of the disease. In the host range test, the virus induced systemic mosaic symptoms on many cruciferous crops including Chinese mustard (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*), Chinese white cabbage (*B. campestris* ssp. *chinese* var *communis*), radish (*Raphanus sativas*), rape (*B. campestris*) and mustard (*B. juncea*), and developed necrotic local lesions on *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa* and three other *Nicotiana* species. It was shown transmissible by aphid (*Myzus persica*) in a non-persistent manner. Electron microscopic examination of ultrathin sections of infected leaf cells of lisianthus revealed inclusions of laminated aggregates and scrolls in the cytoplasm. Filamentous particles were also purified from infected leaves of *B. juncea* by polyethylene precipitation followed by CsCl isopycnic centrifugation. Relative molecular weight of the coat protein subunit of the virus was estimated as 37 kDa. Results of SDS-immunodiffusion, indirect ELISA and Western blotting tests indicated that the virus isolate from lisianthus was serologically indistinguishable from a radish isolate of turnip mosaic virus (TuMV) but

different from three other potyviruses commonly found in ornamental crops. Based on host reactions, particle and inclusion morphology, transmissibility by aphid, chemical and physical properties of coat protein and serological properties, the virus causing yellow spotting disease of lisianthus was identified as an isolate of TuMV. This is the first record for lisianthus as a natural host of TuMV.

Keywords: Lisianthus (*Eustoma russellianum* (Don.) Griseb) ; turnip mosaic virus (TuMV)