

胡瓜嵌紋病毒感染引起的港口馬兜鈴嵌紋病之鑑定

陳金枝¹ 張清安^{1,3} 林玫珠¹ 方懷盛²

1. 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所 植物病理系
 2. 南投縣集集鎮 行政院農業委員會 特有生物保育中心 動物組
 3. 聯絡作者：電子郵件cachang@wufeng.tari.gov.tw
- 接受日期：中華民國89年3月31日

摘要

陳金枝、張清安、林玫珠、方懷盛。2000. 胡瓜嵌紋病毒感染引起的港口馬兜鈴嵌紋病之鑑定. 植病會刊9:29-34.

港口馬兜鈴 (*Aristolochia zolligeriana* Miq., 簡稱馬兜鈴) 為鳳蝶幼蟲之取食植物, 晚近於特有生物保育中心試驗區中發現所栽植之部份馬兜鈴植株葉片出現系統性嵌紋病徵, 經接種試驗、血清反應法及核酸分析鑑定結果, 證實為胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic cucumovirus, CMV) 感染所引起。本研究利用CMV之局部病斑寄主, 奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.), 進行單斑分離及接種, 獲得一分離株 (Az1) 做為本研究後續試驗之代表病毒分離株。將Az1接種於健康之馬兜鈴實生幼苗, 約30天後其葉片會出現與田間罹病株相同之嵌紋病徵。接種於 *Nicotiana benthaminana* Domin. 及 *N. tabacum* cv. *Xanthi* 等煙草品種, 亦可引起系統性嵌紋病徵。將接種 Az1 之 *N. benthaminana* 葉片材料進行除色褪綠處理並濃縮後, 以電顯觀察可發現大小約為30 nm之球型病毒顆粒, 其外型及大小均與CMV顆粒之特性類似。於ELISA反應中, 田間表現嵌紋病徵之馬兜鈴及Az1分離株之接種材料均與對照CMV抗血清產生強烈正反應。於SDS-免疫擴散反應中上述材料均與CMV抗血清產生專一性沈澱反應, 且與對照標準CMV抗原產生無法分辨差異之同源性反應 (identical reaction)。利用對應CMV之專一性引子對, 分別以田間馬兜鈴病株葉片、感染Az1之煙草與馬兜鈴之總量核酸為模版, 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR), 均可獲得一大小約486 bp之核酸片段, 其大小與以CMV核酸為模版所增幅之預估值相符。而且這些 RT-PCR 增幅產物均可與非放射性標定之對照 CMV 核酸探針產生雜配反應 (hybridization)。上述材料若以tomato aspermy cucumovirus (TAV) 之專一性引子對進行RT-PCR時均未能獲得任何增幅產物。將Az1分離株之486 bp PCR核酸產物選殖於pCR II載體並進行核苷酸序列分析, 結果亦顯示其與已知CMV之相關核苷酸序列相符, 經比對後發現二者之相同度高達92~93%。而此序列範圍內所對應之鞘蛋白3'端60個氨基酸序列, 則與對應之CMV已知序列達到98%之相同度。綜合上述鑑定結果, 本研究證明CMV為引起港口馬兜鈴發生嵌紋病之致病病原, 港口馬兜鈴則為CMV之新記錄寄主。

關鍵詞：港口馬兜鈴、胡瓜嵌紋病毒、鑑定、PCR偵測、核酸探針、雜配反應

緒言

港口馬兜鈴 (*Aristolochia zolligeriana* Miq.) 為馬兜鈴科 (*Aristolochiaceae*) 之蔓性藤本植物, 特產於蘭嶼及台灣南端, 分佈於港口及港口溪以南地區^(1,4)。由於生育環境遭受人為的不斷破壞, 數量正逐漸減少中, 加以種子的發芽率偏低, 以人工扦插繁殖的成活率也不理想, 因此已被歸為稀有之保育類植物^(1,4)。港口馬兜鈴為已瀕臨滅絕危機之黃裳鳳蝶之偏好性取食植物, 因此馬兜鈴族群的盛衰直接影響鳳蝶類的生存^(1,4)。本研究於國內之特有生物保

育中心所栽植之馬兜鈴園圃中, 發現部分植株葉片出現嵌紋病徵, 鑒於馬兜鈴為保育類植物及其為另一稀有保育類蝴蝶之重要食物來源, 因此針對其病因進行探討, 鑑定結果顯示其乃由胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic cucumovirus, CMV) 感染所造成, 而且與另一個同為 *Cucumovirus* 屬之tomato aspermy cucumovirus (TAV) 在分子層次上有明顯差異。本文乃敘述此致病病毒 CMV 之生物、血清及分子層次特性及其鑑定之過程, 供栽植馬兜鈴時擬定防治方法之參考。

材料與方法

病毒來源、保存方法與接種試驗

本研究自位於南投縣集集鎮之特有生物保育中心試驗園圃採得葉片出現嵌紋病徵之港口馬兜鈴植株，將其移植於盆栽中，並栽培於防蟲網室內保存作為實驗用材料。另外取部份病葉切成約1 cm正方形小組塊，浸漬於50 % glycerol溶液中並保存於-20 °C下，作為長期保存材料。接種時將罹病葉以0.05 M、pH 7.5之磷酸鉀緩衝液(potassium phosphate buffer)，以1 : 10 (g/ml) 比例研磨成汁液，利用機械接種法接種於莖藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片，取其單斑進行連續三次之單斑篩選接種，爾後將所得單斑接種於煙草 (*Nicotiana benthaminana* Domin.) 上繁殖成為純系分離株 (Az1)，作為本研究各項試驗用之代表性病毒株。

病毒型態之觀察

將Az1接種於煙草 (*N. benthaminana*) 後二星期，取50 g病葉以100 ml之0.1 M citrate buffer (pH 6.5) ⁽⁹⁾ 研磨均質後，依照Christie等人所發展之CVC法 (clarified viral concentrate) 進行病毒之除色褪綠與濃縮處理 ⁽⁹⁾。所得試料以2 % PTA (phosphotungstic acid) ⁽¹¹⁾ 進行陰染及電顯觀察 (HITACH H-7000)。

ELISA及SDS-免疫擴散反應

取0.1 g之田間馬兜鈴嵌紋病病葉，及分別接種Az1之煙草與馬兜鈴葉片組織，以3 ml之15 mM碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入EIA反應盤內 (100 µl/well) 進行覆膜反應 (coating reaction)，其次分別以對應CMV (cucumber mosaic cucumovirus) ⁽³⁾、BYMV (bean yellow mosaic potyvirus) ⁽⁷⁾ 及Potyvirus-specific monoclonal antibody (Agdia Inc. Elkhart, USA.) 等抗體之免疫球蛋白 (IgG) 進行ELISA反應，詳細之測定流程如已發表之報告所述 ^(5,7)。另外，分別取1 g之上述三種罹病組織於研鉢內與1 ml之3 % SDS溶液及1 ml之二次蒸餾水研磨混勻，再以兩層紗布過濾，取其濾液以熱水 (95 ~ 100 °C) 間接加熱3分鐘，作為SDS處理抗原 (SDS-treated antigens)，分別與CMV及BYMV之抗血清進行SDS-免疫擴散反應 ⁽¹³⁾。

反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)

將田間罹嵌紋病之馬兜鈴病葉，及接種Az1之煙草與馬兜鈴幼苗，分別取0.1 g病葉於液態氮中研磨成粉，利用植物全量RNA純化試劑組 (Qiagen, Hilden, Germany) 進行全量RNA (total RNA) 之純化。根據Singh *et al.* ⁽¹⁴⁾ 所發表之CMV專一性引子對 (CMV 1 : 5'-GCCGTAAGCTGGATGGACAA-3', CMV 2 : 5'-TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG- 3')，於3 µl之植物全

量RNA中，加入3 µl之1 µM CMV 1引子，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，於每一50 µl反應液中分別加入2 µl cDNA、5 µl 10x PCR buffer、4 µl 2.5 mM dNTP、0.5 U Ex-Taq polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)、及各2.5 µl之20 µM CMV 1及CMV 2引子對，於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中進行26個PCR循環反應。反應程序為94 °C下變性1分鐘，60 °C下煉合1分鐘，72 °C下聚合2分鐘，最後一個循環中之72 °C聚合反應延長為8分鐘。此一反應預估可增幅出大小約500 bp之核酸產物 ⁽¹⁴⁾，反應結果以電泳進行分析。本試驗另外針對與CMV同為Cucumovirus屬之TAV核酸序列 (Genebank, Acc. no. D01015) ⁽¹²⁾，設計了一對專一性引子 (5'-TAGGTTTGTGAGTGTTAGA-3' / 5'-ATCTTCACAATCACAT CCAT- 3')，同樣就上述材料進行RT-PCR，所有反應條件除煉合反應改為52 °C外，其餘與上述CMV之反應條件相同。

核酸片段選殖和核苷酸序列分析

將自馬兜鈴嵌紋病株以RT-PCR增幅所得大小約500 bp之DNA片段選殖於pCR II載體上 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)，再將篩選出具有500 bp嵌入序列之選殖株送交明欣生物技術公司，進一步以ABI PRISM 377-96 DNA序列分析儀 (Perkin-Elmer, CA, USA) 及其配用之非放射性標識反應試劑組 (ABI PRISM BioDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) 進行核苷酸序列分析，分析所得並以Scan DNASIS核酸序列分析軟體 (Hitachi Software Engineering America, Ltd., California, USA) 進行分析比對。

非放射性南方雜配分析 (Non-isotopic southern blot hybridization analysis)

將田間罹嵌紋病之馬兜鈴病葉，及接種Az1之煙草與馬兜鈴幼苗，分別以CMV 1 / CMV 2引子進行RT-PCR反應，所增幅之核酸產物片段以1.2 % Agarose電泳分析，所得電泳膠片經depurination溶液 (0.25 N HCl) 處理、denaturation溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) 變性、及neutralization溶液 (1.0 M Tris-HCl, pH 8.0, 1.5 M NaCl) 中和後，再以10x SSC transfer溶液轉漬於Nylon膜上 (Stratagene Inc., La Jolla, CA)，轉漬膜經UV cross-linker作用後，置於玻璃滾筒內，於42 °C恆溫下進行雜配反應。雜配反應所使用之核酸探針，乃利用上述CMV引子對將確知感染百合之CMV ⁽³⁾ 進行增幅，取其大小約500 bp之DNA產物，進行Biotin非放射性標定 (BrightStar™, Psoralen-Biotin, Ambion Inc. Texas, USA) 而成，探針之使用濃度為1 nM。探針標定方式及雜配反應之程序，均依照廠商之所附之程序進行。雜配反應結果以CDP-Star™

(Tropix Inc., Massachusetts, USA) 進行反應偵測並將結果記錄於X-ray底片，所有反應方式均依照廠商之建議完成。

結果

寄主接種試驗

由田間出現嵌紋病徵之馬兜鈴植株，將其罹病葉（圖一, A）之汁液接種於奎藜，約第2~3天即可於接種葉發現局部病斑，挑取單一病斑接種於奎藜，如此連續進行三次之單斑分離接種，最後將單斑接種於煙草 (*N. benthaminana*) 上，繁殖成為純系分離株 (Az1)。除 *N. benthaminana* 外，將 Az1 接種於 *N. tabacum* cv. *Xanthi*，於接種後第10天左右此兩種煙草上均會出現系統性之嵌紋病徵（圖一, C）。若將 Az1 接種於健康之馬兜鈴實生幼苗葉片，於接種後第30天左右，植株表現系統性之嵌紋病徵（圖一, B），與田間發生之病徵相同，證明 Az1 為引起馬兜鈴嵌紋病之致病病毒。

病毒顆粒型態之觀察

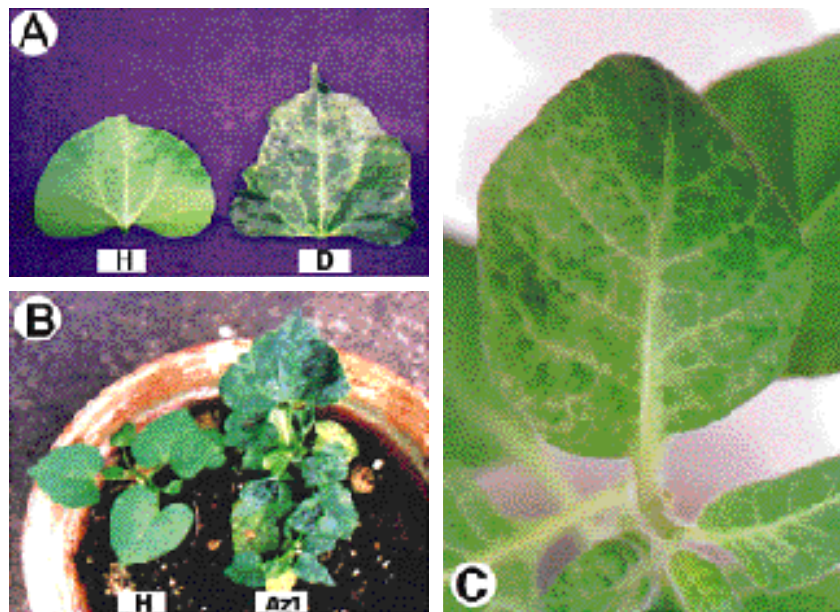
利用 Christie *et al.* (1987) 所發表濃縮感病材料中病毒顆粒以方便電子顯微鏡觀察顆粒型態之方法，針對接種 Az1 之 *N. benthaminana* 煙草，進行病毒顆粒形態觀察，結果於 60,000x 之電子顯微鏡放大倍率下，可以明顯發現直徑約 30 nm 之球形病毒顆粒（結果未示），此種顆粒型態與胡瓜嵌紋病毒 CMV 之特性相符⁽¹⁰⁾。

ELISA及SDS-免疫擴散反應鑑定

本試驗採取田間罹患嵌紋病之馬兜鈴，分別感染 Az1 之煙草及馬兜鈴等三種材料，先以 ELISA 法與對應 CMV、BYMV、及 Agdia 公司出品之 *Potyvirus-specific* 單株抗體等三種免疫球蛋白進行反應，反應結果發現此等樣品均僅與 CMV 抗血清產生正反應，初步顯示感染馬兜鈴之病毒應該不是馬鈴薯 Y 屬病毒，而是 CMV 或至少是與 CMV 血緣極為接近之病毒。為釐清 Az1 與 CMV 間之血緣關係，本試驗進一步以 SDS-免疫擴散反應進行比對，發現上述三種樣品僅與 CMV 之抗血清產生沈澱反應，且三者與 CMV 之對照抗原產生無法區別，即無 spur 出現之同源性反應 (identical reaction) (圖二)。此等血清學反應，證明 Az1 分離株至少在血清學特性上與 CMV 完全相同。

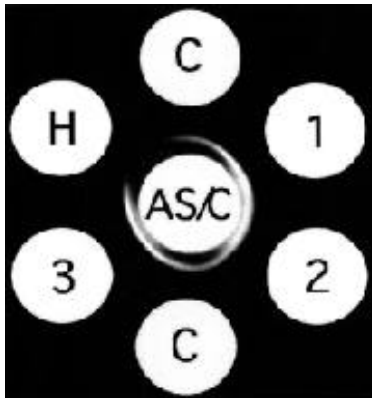
應用RT-PCR之鑑定

為進一步釐清 Az1 分離株與 CMV 在分子層次上之關係，本試驗利用 Singh *et al.*⁽¹⁴⁾ 所發表之 CMV 專一性引子對 CMV 1 / CMV 2 就 Az1 分離株進行 RT-PCR，反應結果確實可增幅出一大小約 500 bp 而與預估值相符之核酸產物 (圖三, B)。此引子對若與田間馬兜鈴病葉及接種 Az1 之馬兜鈴葉片組織反應，亦可增幅出相同大小之核酸片段 (圖三, B)。然而此 CMV 引子對除了與健康對照馬兜鈴不反應外，卻可與感染菊花之 TAV RNA 反應，而增幅出一個大小約 600 bp 與 CMV 產物大小不同之核酸片段 (圖三, B)。



圖一、港口馬兜鈴嵌紋病病徵。(A)圖右標示D者乃採自田間罹患嵌紋病之港口馬兜鈴葉片；圖左標示H者則為健康馬兜鈴無病徵葉片。(B)圖右標示Az1者為Az1分離株接種健康馬兜鈴後葉片出現之嵌紋病徵；圖左標示H者則為健康馬兜鈴無病徵幼苗。(C)Az1接種於*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*煙草所出現之系統性嵌紋病徵。

Fig. 1. Photographs showing the symptoms of *Aristolochia zolligeriana* (A, B) and *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* (C) induced by Az1 isolate of cucumber mosaic cucumovirus. The leaf denoted as D is the symptomatic leaf of *A. zolligeriana* collected from the field; the one denoted as Az1 is the Az1-inoculated leaf of *A. zolligeriana*; while the one denoted as H is the healthy control.



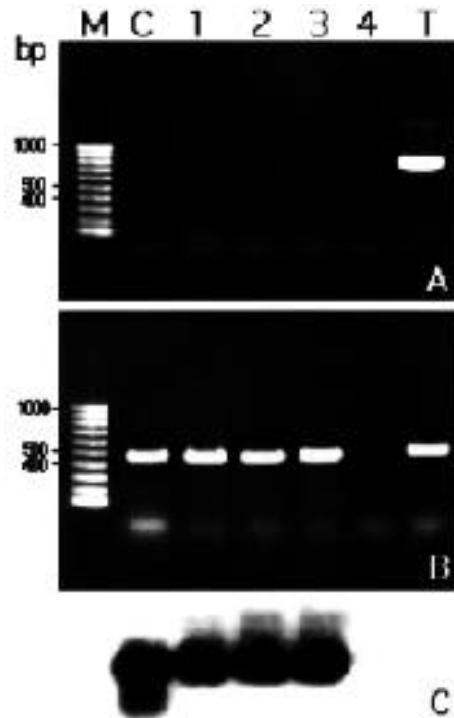
圖二、利用SDS-免疫擴散反應鑑定引起港口馬兜鈴嵌紋病之胡瓜嵌紋病毒Az1分離株。中間穴(As/C)乃添加對應胡瓜嵌紋病毒百合分離株之抗血清，周圍六穴乃分別添加對照用之胡瓜嵌紋病毒百合分離株之標準抗原(C)、田間馬兜鈴嵌紋病病葉(1)、接種Az1分離株之煙草 *Nicotiana benthamiana* (2)及馬兜鈴(3)抗原、及健康馬兜鈴對照抗原(H)。

Fig. 2. Identification of the causal agent, Az1 isolate, of *Aristolochia zolligeriana* mosaic disease by sodium dodecyl sulfate-immunodiffusion test. The SDS-treated antigens of diseased *A. zolligeriana* collected from the field (1), Az1-inoculated leaves of *Nicotiana benthamiana* (2) and *A. zolligeriana* (3), healthy leaf of *A. zolligeriana* (H) and control antigen of cucumber mosaic cucumovirus (CMV) (C) were added in the peripheral wells to react with undiluted antiserum against CMV (As/C) applied in the center well. Noted that identical serological reactions were found between Az1 and control CMV antigen.

然而，此增幅自TAV之DNA片段與CMV之專一性核酸探針不產生任何雜配反應(圖三，C)，此與增幅自Az1材料之500 bp片段能與CMV探針發生強烈雜配反應之特性完全不同。上述結果證明Az1分離株確實在分子層次之特性上與CMV幾近相同，而且與同屬 *Cucumovirus* 之TAV具極明顯之差異。此項結論在後續之RT-PCR試驗中進一步發現利用TAV之專一性引子對並不會與Az1分離株反應，獲得進一步之證實(圖三，A)。

核苷酸序列解析與比對

本研究將Az1分離株經RT-PCR所增幅之核酸片段加以選殖並進行核苷酸序列分析，結果共獲得486 bp之序列(圖四)。將此序列與Genebank上已正式登錄之CMV核苷酸序列進行比對，發現其乃對應於RNA 3'上之鞘蛋白基因3'端的部份序列及部份之3'非轉譯區(3' nontranslated region, NTR) 序列。將Az1之486 bp片段與Singh, Z.等人⁽¹⁴⁾及Chaumpluk, P.⁽⁸⁾等人所發表之CMV核酸相對位置進行比對，其核苷酸序列相同度(nucleotide identities)分別達到93及92%，而此範圍中之60個氨基酸序列之相同度(amino acid identities)則高達98%。此一核酸序列比對結果，完全印證上述各項實驗所做Az1分離株即為CMV結論之正確性。

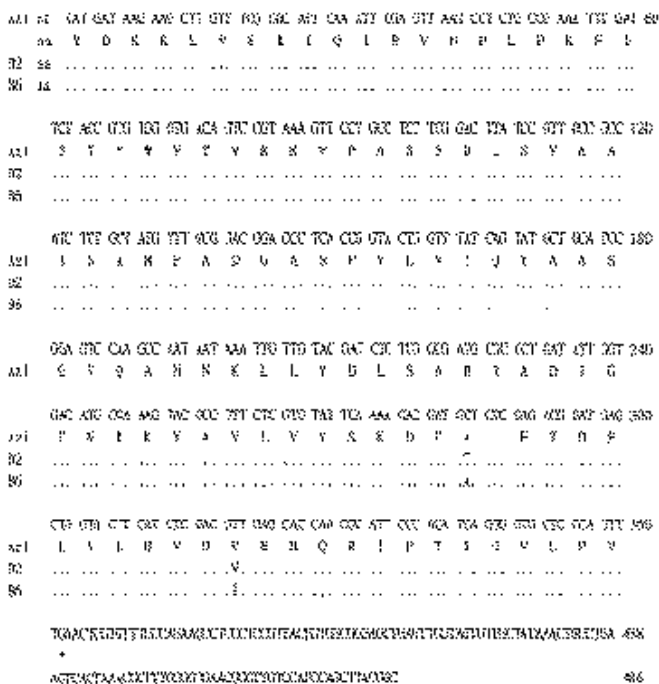


圖三、應用反轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)及核酸探針雜配法(DNA probe hybridization)鑑定引起港口馬兜鈴嵌紋病之胡瓜嵌紋病毒Az1分離株。(A)利用對應tomato aspermy cucumovirus (TAV)之專一性引子對進行RT-PCR之結果。(B)利用對應cucumber mosaic cucumovirus (CMV)之專一性引子對進行RT-PCR之結果。(C)以Biotin標定之CMV核酸探針就B圖之結果進行南方雜配分析。C及T分別代表以已知CMV及TAV之RNA為模版所獲得之結果，行1~4分別為田間感病之馬兜鈴、接種Az1之煙草 *Nicotiana benthamiana*、接種Az1之馬兜鈴及健康馬兜鈴葉片，M為標準100 bp DNA梯級標誌。

Fig. 3. Molecular identification of Az1 isolate of cucumber mosaic cucumovirus (CMV), the causal agent of *Aristolochia zolligeriana* mosaic disease by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and DNA probe hybridization. (A) result of RT-PCR using primer pair specific for the amplification of tomato aspermy cucumovirus (TAV). (B) RT-PCR result using primer pair specific to CMV. (C) southern blot hybridization result of the same samples from figure (B) using biotin-labeled DNA probe specific to CMV. Lane M, 100 bp DNA ladder markers; Lane C and T are control samples of CMV and TAV, respectively; Lane 1-4 are field collected diseased *A. zolligeriana*, Az1-inoculated *Nicotiana benthamiana* and *A. zolligeriana*, and healthy control of *A. zolligeriana*, respectively.

討論

本研究針對引起港口馬兜鈴嵌紋病之病原進行分離鑑定，由罹病葉汁液接種於莖藜後，於第2~3天便出現單斑，此種短時間內可於莖藜接種葉形成單斑之現象，符合CMV原有之生物特性。而其單斑分離株Az1於後續之ELISA、SDS-免疫擴散反應等血清診斷，及RT-PCR、核



圖四、引起港口馬兜鈴嵌紋病之胡瓜嵌紋病毒 Az1分離株經CMV專一性引子對進行 RT-PCR所增幅產出之 486 bp DNA片段之核苷酸與氨基酸序列及其與已知 CMV序列之差異。

Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the RT-PCR product amplified from the Az1 isolate of cucumber mosaic virus (CMV), the causal agent of the mosaic disease of *Aristolochia zolligeriana*, and their differences with other known CMV isolates of D2 (Chaumplik, P. *et al.*, 1996) and B6 (Singh, Z., *et al.*, 1995). nt and aa represent nucleotide and deduced amino acid sequences, respectively. "." denotes conservatives between the sequences for comparison. Symbol of * indicates codon for the termination of translation.

甘酸序列分析及核酸雜配反應等核酸分析鑑定結果，均一再顯示Az1具備CMV特性之證據。進一步之寄主接種試驗更證實，Az1可造成馬兜鈴植株出現與田間罹病株相同之嵌紋病徵，明確顯示CMV即為引起馬兜鈴發生嵌紋病之病原。

鑑於文獻上記載同屬於 *Cucumovirus* 之CMV與TAV間有某些基因表現特性相當接近 (12)，為釐清本研究之Az1確屬CMV無誤，因此於RT-PCR試驗中分別以對應CMV及TAV之專一性引子對進行反應，結果顯示CMV之引子對除與Az1反應增幅出與預估值 500 bp大小相符之核酸片段外，亦可與TAV反應增幅出一個大小約 600 bp之核酸片段 (圖三, B)，顯示CMV與TAV二者間至少有部份核酸序列十分接近，但由TAV所增幅之600 bp片段除分子量不同外，於後續之南方雜配反應中並不與CMV之核酸探針反應 (圖三, C)，證明二者間之序列雖然接近但仍有明顯差異。相反地，應用TAV之引子對僅能與TAV反應 (圖三, A)，而不與CMV RNA反應，因此更加確定感染馬兜鈴造成嵌紋病

徵之Az1分離株係屬CMV而非TAV。上述以RT-PCR及探針雜配法快速鑑別CMV與TAV之方式，除證明可有效應用於本研究中馬兜鈴嵌紋病致病病毒種類之鑑定外，相信亦可作為其他作物感染CMV或TAV時快速鑑別之參考技術。

CMV之寄生範圍相當廣，近年來本研究室於百合等多種球根花卉上亦曾發現CMV之感染 (2,3)。本研究結果證明CMV可感染港口馬兜鈴，則為其寄主種類之一項新記錄 (6)。由於CMV在自然界乃藉由蚜蟲以非永續型方式傳播，本研究雖未直接提出蚜蟲傳播之實驗證明，但是本病在自然界中以此方式傳染應該是無庸置疑的，因此本病在南投集集特有生物保育中心試驗園圃之發生，應是附近CMV藉由蚜蟲傳進之結果。由於港口馬兜鈴已被歸為稀有之保育類植物，其亦為已瀕臨滅絕危機之黃裳鳳蝶幼蟲之主要取食植物，馬兜鈴族群的盛衰直接影響鳳蝶類的生存，本研究結果可提供人工栽植馬兜鈴時研擬預防嵌紋病策略之依據。至於馬兜鈴受CMV感染後是否會影響鳳蝶幼蟲對其葉片之取食偏好，以及取食感染CMV之罹病葉是否會影響鳳蝶之生長發育，則有待昆蟲專家進一步探討。

謝辭

本研究期間承江芬蘭、蔡惠婷、謝孟娟、謝孟純、及王詩雯小姐提供諸多良好技術協助得以完成，僅此致以由衷謝意。本系廖吉彥先生協助電子顯微鏡之觀察，謹此表達衷心謝忱。

引用文獻

- 邱文良. 1991. 恆春自然保護區植群之研究. 林業試驗所研究報告季刊6(3):203-227.
- 張清安. 1993. 台灣花卉病毒病害. 台灣花卉病蟲害研討會專刊p213-224.
- 張清安、陳金枝、鄧汀欽、蔡惠婷. 1996. 百合斑紋、百合隱微型及胡瓜嵌紋等三種病毒於百合植株上分佈之差異及三者對不同病徵型表現之影響. 植保會刊38:372.
- 葉慶齡. 1994. 恆春半島山地植群生態及其保育評估. 國立台灣大學森林學研究所博士論文. 台北.
- 陳金枝、張清安、戴廷恩. 1999. 菜豆黃化嵌紋病毒及胡瓜嵌紋病毒在唐菖蒲葉片之分佈及其對病毒檢測之影響. 植病會刊8:117-120.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (Eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.
- Chang, C. A., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyviruses. *Phytopathology* 78:1266-1275.

8. Champluk, P., Sasaki, Y., Nakajima, N., Nagano, H., Nakamura, I., Suzuki, K., Mise, K., Inouye, N., Okuno, T., and Furusawa, I. 1996. Six new subgroup I members of Japanese cucumber mosaic virus as determined by nucleotide sequence analysis on RNA 3's cDNAs. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62: 40-44.
9. 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.*
10. Francki, R. I. B. 1985. The viruses and their taxonomy. p.1-18. In: Francki R.I.B. (ed.) *The plant viruses I: polyhedral virions with tripartite genomes.* Plenum Press, New York.
11. Hall, C. E., Jakus, M. A., and Schmitt, E. O. 1945. The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains. *J. Appl. Phys.* 16: 459-465.
12. O'Reilly, D., Thomas, C. J. R., and Coutts, R. H. A. 1991. Tomato aspermy virus has an evolutionary relationship with other tripartite RNA plant viruses. *J. Gen. Virology* 72: 1-7.
13. Purcifull, D. E., and Batchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. *Fla. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 788. 39 pp.
14. Singh, Z., Jones, R. A. C., and Jones, M. G. K. 1995. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Dis.* 79: 713-716.

ABSTRACT

Chen C. C.¹, Chang, C. A.^{1,3}, Lin, M. J.¹, and Fang, H. S.² 2000. Identification for the infection of cucumber mosaic cucumovirus on *Aristolochia zolligeriana*. *Plant Pathol. Bull.* 9:29-34. (¹ Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wu-Feng, Taichung 413, Taiwan, R. O. C., ² Division of Zoology, Taiwan Endemic Species Research Institute, Chichi, Nantou 552, Taiwan, R. O. C., ³ Corresponding author, E-mail: cachang@wufeng.tari.gov.tw)

The *Aristolochia zolligeriana* Miq. (AZO), a native species of *Aristolochiaceae* in Taiwan, is the major victual plant of the larva of *Papilio* spp. butterfly in nature. During artificial cultivation of AZO, some plants exhibiting systemic mosaic symptoms were found in one of the experiment plantation in Taiwan Endemic Species Research Institute. A virus isolate (Az1) was obtained from the diseased AZO plants by three successive local-lesion selections on *Chenopodium quinoa* and subsequently propagated in *Nicotiana benthamiana*. The same mosaic symptom as that on the original diseased plants was reproduced on healthy AZO seedlings by inoculation with Az1, indicating that Az1 should be the causal agent of AZO mosaic disease. Besides AZO, Az1 could infect *N. benthamiana* and *N. tabacum* cv. *Xanthi* and induce systemic mosaic symptoms. By electron microscopy, isometric particles with approximately 30 nm in diameter was observed in negatively stained sample obtained from clarified viral concentrate (CVC) procedure described by Christie *et al.* (1987). In ELISA test, field collected tissue from diseased AZO, Az1-inoculated tissues of *N. benthamiana* and AZO were all strongly reacted with the antiserum against cucumber mosaic cucumovirus (CMV) but not with antiserum against bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) and *Potyvirus*-specific monoclonal antibody (Agdia Inc.). In addition, these antigens were all indistinguishable to the control CMV antigen when tested in sodium dodecyl sulfate-immunodiffusion test. Using a primer pair designed for specific amplification of CMV, a 486-bp DNA fragment equivalent to the one amplified from the control CMV, was produced from Az1-infected tissues by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The same primer pair could also amplify tomato aspermy cucumovirus (TAV), a virus serologically related to CMV, but produced a DNA fragment larger than that amplified from CMV. However, only the DNA product amplified from Az1-infected tissue, but not the one amplified from TAV, could be hybridized with the biotin-labeled DNA probe of CMV. Furthermore, a primer pair for specific amplification of TAV could not amplified any product from Az1-infected tissues, confirming that Az1 was an isolate of CMV instead of TAV. When the 486-bp DNA fragment was cloned and sequenced, it was found corresponding to 3'-terminal region of coat protein gene and part of the 3'-nontranslated region of CMV RNA 3. Comparing with the known CMV sequences from the Genebank, this Az1 DNA fragment shared 92-93% and 98% of identities in the nucleotide and deduced amino acid sequence, respectively. Based on the biological, serological and molecular properties of Az1 as revealed in this study, the virus should reasonably be recognized as an isolate of CMV. To our knowledge, this is the first report of *A. zolligeriana* as a natural host species for CMV.

Keywords : *Aristolochia zolligeriana*, CMV, identification, PCR detection, DNA probe, hybridization