

應用反轉錄聚合酶鏈鎖反應偵測蘋果黃化葉斑病毒和蘋果莖凹陷病毒

詹富智^{1,4}、吳榮彬¹、郭瓊臻²、鄭允琇¹、張賀雄¹、蘇秋竹³、楊耀祥²

1 台中市 國立中興大學植物病理學系

2 台中市 國立中興大學園藝學系

3 台中縣 行政院農委會農業藥物毒物試驗所

4 聯絡作者：電子郵件 fjjan@nchu.edu.tw，傳真：+886-4-22854145

接受日期：中華民國92年2月28日

摘要

詹富智、吳榮彬、郭瓊臻、鄭允琇、張賀雄、蘇秋竹、楊耀祥, 2003. 應用反轉錄聚合酶鏈鎖反應偵測蘋果黃化葉斑病毒和蘋果莖凹陷病毒. 植病會刊12:10-18.

蘋果黃化葉斑病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) 和蘋果莖凹陷病毒 (*Apple stem grooving virus*, ASGV) 為感染薔薇科果樹並引起經濟危害之重要病原。過去台灣並未有任何有關梨及蘋果病毒病害的報導，但台灣每年自日本進口大量梨接穗嫁接以生產高價值之溫帶梨，這些梨接穗可能攜帶病毒而危害台灣梨產業上的風險頗大，因此，針對梨及蘋果之病毒病害發展快速準確的偵測系統實為目前所迫切需要。本研究由 ASGV 鞘蛋白基因 (coat protein gene, CP) 及 ACLSV 複製酶基因 (replicase gene, ORF 1) 區域設計簡併式引子對，建立 ASGV 及 ACLSV 之反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 偵測技術。RT-PCR 反應增幅出之產物進一步進行基因選殖及定序後，共獲得 5 個 ASGV 台灣分離株之部分鞘蛋白核酸序列，其核酸片段大小為 516 bp，及 1 個 ACLSV 台灣分離株之部分 ORF 1 核酸序列，其核酸片段大小為 426 bp。將 ASGV 部分鞘蛋白基因及 ACLSV 部分 ORF1 基因序列與國外已發表之 ASGV 及 ACLSV 分離株分別進行核酸序列分析，ASGV 部分鞘蛋白基因序列與國外已發表之 ASGV 分離株具 90.3-98.4% 之核酸相同度及 95.8-98.8% 之胺基酸相同度，而 ACLSV 之部分 ORF 1 基因序列與國外已發表之 ACLSV 分離株間有 77.7-85.2% 之核酸相同度及 92.2-99.3% 之胺基酸相同度。我們亦利用所建立之 RT-PCR 系統去探討台灣梨疑似衰弱病株中此二病毒感染的情形，經 RT-PCR 偵測結果，在 21 株病株中有 14 株可偵測到 ASGV 或 ACLSV，而此 14 株中有 2 株為此二病毒之複合感染。除此之外，我們亦利用所建立之 RT-PCR 技術檢測進口梨接穗，於 2001 年 10 月至 2002 年 1 月間，359 枝由日本進口之抽檢梨接穗中，共測得三組樣品受 ASGV 感染。總括而言，在本研究中針對梨罹病葉或接穗樣品所進行之 ASGV 及 ACLSV 病毒偵測，已完整建立起一套便捷且靈敏的 RT-PCR 偵測技術，此外本研究亦首次發現目前台灣主要栽培之梨樹品種橫山梨 (*Pyrus pyrifolia* var. *Hengshen*) 已受到 ASGV 及 ACLSV 之感染。

關鍵詞：蘋果黃化葉斑病毒、蘋果莖凹陷病毒、反轉錄聚合酶鏈鎖反應、梨接穗

緒言

梨為薔薇科 (*Rosaceae*) 梨屬 (*Pyrus*) 作物，為台灣地區重要經濟果樹之一，種植面積超過九千公頃，產值逾三十六億元，面積及產值均佔整體果樹產業之百分之六強，產值佔農產品之百分之二。二⁽¹⁾；依台灣植物誌第二版之紀錄⁽³⁾，台灣原生種有兩種，分別為台灣野梨 (*Pyrus taiwanensis* Iketani & Ohashi) 與豆梨 (*P. calleryana* Decne.)

⁽³⁾。台灣野梨為台灣特有種，分布在中部地區 500 至 1500 公尺的區域，而豆梨則分布於越南、中國與日本，在台灣地區主要於北部與中部海拔約 500-1000 公尺的地區。而台灣地區目前主要栽培品種橫山梨 (*P. pyrifolia* var. *Hengshen*)，約於十九世紀末自華南引進台灣，因其於台灣低海拔氣候環境生長適應良好，栽培最為普遍。農民經常以橫山梨徒長枝作為砧木並嫁接由各地所引進之不同品種梨接穗，以提高產值及經濟效益⁽²⁾。

已知感染梨樹之重要病毒最少有十種病毒⁽¹⁰⁾，主要有蘋果莖凹陷病毒 (*Apple stem grooving virus*, ASGV)、蘋果黃化葉斑病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV)、蘋果莖痘斑病毒 (*Apple stem pitting virus*, ASPV) 和蘋果嵌紋病毒 (*Apple mosaic virus*, ApMV) 等，其中以 ASGV、ACLSV 及 ASPV 為影響蘋果及梨樹產業上較為嚴重且普遍存在之病毒。當栽培果樹受此些病毒感染並潛伏於其上時，常引起產值和經濟之損失。ASGV 屬 *Capillovirus*，為長絲狀單股正極 RNA 病毒，長約 600 至 700 nm、寬約 12 nm，其核酸基因組約為 6.5 kb^(15,18)。ACLSV 屬 *Trichovirus*，長絲狀單股正極 RNA 病毒，長約 720 至 740 nm、寬約 12 nm，其核酸基因組約為 7.5 kb^(6,7,14)。以蘋果或梨樹的栽培而言，於國外部分蘋果栽培品種上，在其栽培採收過程中，ASGV 及 ACLSV 會經由污染病毒之器具，以機械性的傳播方式傳播至未受其感染之果樹上⁽¹⁷⁾；或有部分國家為提高其果園之栽種價值，利用不同品種之果樹接穗擷取其優點，以原土地發展之果樹作為砧木，將此接穗嫁接於其枝條上，而此二病毒便會經由接穗隨嫁接枝條而傳播至對此病毒具感受性的砧木上，一旦遭此二病毒感染時，不但會造成產值降低及經濟效益受損外，且當此二病毒共同感染，或伴隨蘋果莖痘斑病毒 (ASPV) 感染時，即導致樹勢衰弱，甚至在幾年內凋零死亡⁽¹⁷⁾。ASGV 於梨樹造成莖部壞疽褐化條斑⁽¹⁶⁾、蘋果上引起莖部槽狀凹陷及嫁接枝條畸形、脆化⁽¹⁰⁾，而 ACLSV 則在梅樹上引起樹皮爆裂、蘋果及梨樹上造成環狀黃化嵌紋斑及果實畸形、及在桃樹上引起綠色的凹陷斑點病^(5,10)。

台灣自 60 年代開始，即每年自日本進口大量梨接穗，用於生產高接梨，但由於過去台灣並無任何梨或蘋果病毒病害之相關紀錄，加上對於梨病毒也還未建立起完善之檢疫技術，因此當每年從日本引進梨接穗時是否也引進重要梨及蘋果病毒而不自知。故為了解台灣梨樹上是否有重要經濟危害之梨病毒，及在進口之梨接穗中是否帶有此些病毒，本研究之目的在於針對薔薇科果樹上極具重要經濟危害性之 ASGV 及 ACLSV 建立快速及專一性高之反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 偵測技術，並配合 ASGV 及 ACLSV 抗血清套組所建立之酵素連結抗體免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 技術以輔助偵測，以為了解台灣梨樹是否遭受病毒危害，並利用所建立之病毒偵測技術應用於台灣梨接穗進口之檢疫。

材料與方法

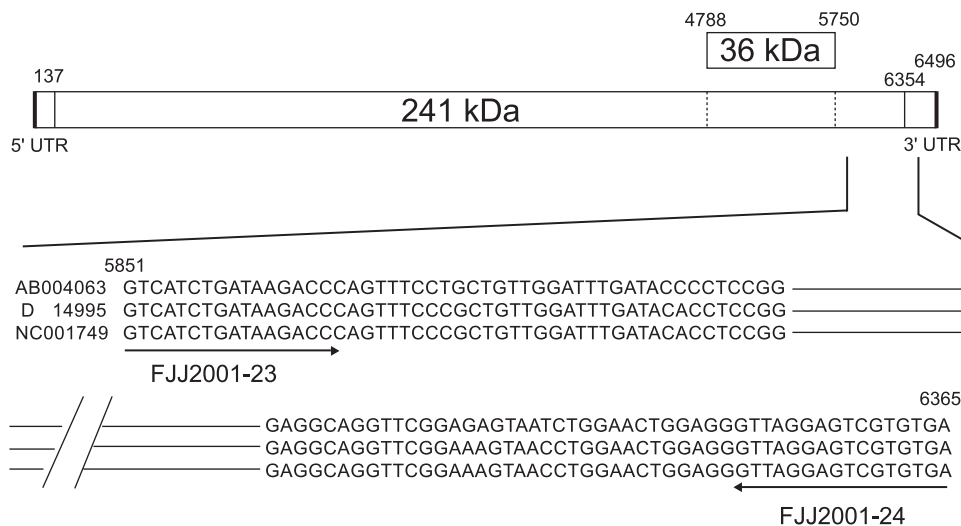
總量核糖核酸 (total RNA) 之抽取

自台灣主要梨栽培地區東勢鎮和平鄉採集本省栽培之

橫山梨上具與國外發表感染 ASGV 及 ACLSV 後所產生之相似病徵，或有褪綠、黃化、嵌紋、葉畸形、小葉、新梢叢生等疑似病毒病病徵之葉片。此外亦自日本進口的梨接穗經海關抽樣的樣品中，以全枝接穗分為上、中、下段，隨機摘取各段花苞以進行偵測。將新鮮之梨葉組織或梨花苞以液態氮研磨後，加入 500 μ l 緩衝液 (solution R, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) 以抽取總量核糖核酸⁽¹¹⁾，經酚/氯仿 (phenol/chloroform) (各 250 μ l) 處理，14000 rpm (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R) 離心 5 分鐘，離心後取上層液加入等體積之 5 M LiCl (lithium chloride)，靜置於冰上至少 3 小時，以 14000 rpm (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R) 離心 15 分鐘後，以 100 μ l 0.3 M NaOAc (sodium acetate) 溶解沉澱物後加入 250 μ l 100% 酒精，於 -80°C 冰箱靜置至少 20 分鐘，再以 14000 rpm (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R) 離心 15 分鐘後，以 DEPC (Diethylene Pyrocarbonate) 處理過之無菌水溶解沉澱物即為總量核糖核酸，置於 -80°C 備用。

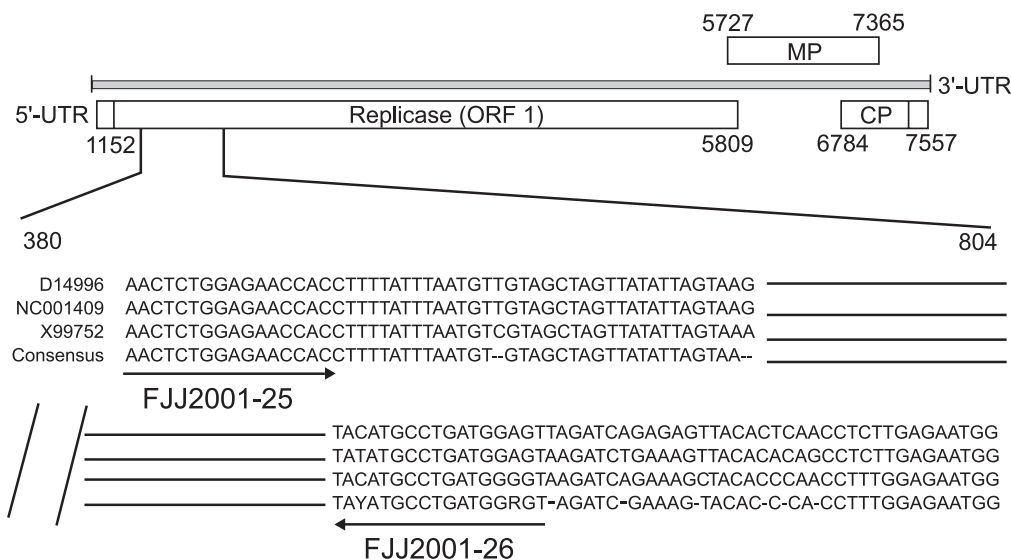
反轉錄聚合酶鏈鎖反應

依據國外已經發表之感染蘋果及梨之病毒序列，於序列高度相同區域設計簡併式引子對 (degenerate primers)，以此簡併式引子對對梨病葉組織或梨花苞所萃取出之總量核糖核酸作為模板，進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應以增幅欲放大之核酸片段。ASGV 之引子對是由已發表之 ASGV 病毒序列^(15,18) 進行比對後，於鞘蛋白基因 (coat protein gene, CP) 序列的高度相同區設計一組引子對 (圖一)，上游引子 FJJ2001-23 之序列為 5'-GTCATCTGATAAGACC-3'，下游引子 FJJ2001-24 之序列為 5'-TCACACGACTCCTAAC-3' (圖一)；而 ACLSV 之引子對亦由已發表之 ACLSV 病毒序列^(6,7,14) 進行比對後，於其複製酶基因 (replicase gene, ORF 1) 序列的高度相同區設計一組簡併式引子對 (圖二)，上游引子 FJJ2001-25 之序列為 5'-AACTCTGGAGAACCACC-3'，下游引子 FJJ2001-26 之序列為 5'-ACR (A,G) CCATCAGGCATY (T,C)TA-3' (圖二)。進行 RT-PCR 時，於總量 RNA 中加入 1 μ l 之 200 ng/ μ l FJJ2001-24 或 FJJ2001-26 及 DEPC-treated water 混和成總體積 16 μ l，於 80-90°C 5 分鐘後置於冰上 5 分鐘，再利用反轉錄試劑組 (Epicentre, M-MLV RT-PCR kit) 加入 1 μ l (10 U/ μ l) M-MLV reverse transcriptase、2.5 μ l 10X reverse transcription buffer、2 μ l 2.5 mM dNTP、3 μ l 0.1 M DTT、及 0.5 μ l RNasin (40 U/ μ l) 於前混合液內，於 42°C 30 分鐘及 37°C 30 分鐘的條件下進行第一股 cDNA 之合成。之後取 4.5 μ l 上述之 cDNA、各 1 μ l 之 200 ng/ μ l FJJ2001-23/FJJ2001-24 或 FJJ2001-25/FJJ2001-26 引子對、Taq DNA polymerase 0.5 μ l (5.0 U/ μ l)、10 μ l 10X Taq reaction buffer [500 mM KCl, 17.5 mM MgCl₂, 100



圖一、由已發表之ASGV 鞘蛋白基因高度相似區設計之FJJ2001-23/FJJ2001-24 引子對。

Fig. 1. Sequences of the primer pair FJJ2001-23/FJJ2001-24 designed from the conserved region of the coat protein genes of three ASGV isolates reported^(15,18). Numbering is consistent with that of Terauchi *et al.*⁽¹⁵⁾.



圖二、由已發表之ACLSV 複製酶基因(ORF 1 gene) 高度相似區所設計之FJJ2001-25/FJJ2001-26 簡併式引子對。

Fig. 2. Sequences of the ACLSV degenerate primer pair (FJJ2001-25 /FJJ2001-26) designed from the conserved regions of ORF 1 of three ACLSV isolates reported^(6,7,14). Numbering is consistent with that of German-Retana *et al.*⁽⁶⁾.

mM Tris-HCl (pH 9.0), 1% Triton X-100]、2 μ l 2.5 mM dNTP 及無菌水使成 100 μ l 之反應液，將其混和均勻後於聚合酶鏈鎖反應機(PTC-200, MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts) 進行 PCR 增幅反應。首先於 93°C 變性 (denature) 反應 5 分鐘後，再進行 34 個循環反應，每一循環反應之程序為 93°C 變性反應 1 分鐘，50°C 黏合 (annealing) 反應 1 分鐘，72°C 聚合反應 2 分鐘，最後再於 72°C 進行延長 (extension) 聚合反應 10 分鐘⁽⁹⁾。PCR 反應後產物以瓊脂膠體電泳法進行分析，其程序乃依一般標準分子生物技術進行⁽¹²⁾。

cDNA 的選殖及部分病毒基因體核酸序列解序分析

RT-PCR 增幅產物經電泳分析後，需將 RT-PCR 增幅產物進行基因選殖並解序以確認此核酸片段為預期之 ASGV 及 ACLSV 兩病毒目標核酸序列，因此進一步將 RT-PCR 的產物利用 TOPO TA 選殖套組 (TOPO TA cloning kit) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 進行基因選殖，挑選出之選殖株，以少量質體抽取組套 (Mini-prep) (Viogene, Sunnyvale, CA) 抽取質體 DNA，先以限制酵素 *EcoRI* 剪切，經 0.8% 膠體電泳分析，選取可能之選殖株，再利用 Sequence Version 2.0 DNA sequencing kit (Epicentre, Cleveland, OH)

以 dideoxy-chain termination 方式⁽¹³⁾ 進行解序，以進一步確認爲正確之選植株，而所得之核酸序列先以 NCBI 基因庫之 BLAST program，初步搜尋以了解是否爲預期之病毒序列，並進一步利用 Clustal algorithm 之比對方式 (MegAlign program of DNASTAR software) 與國外已發表之病毒核酸序列進行比對分析。

酵素連結免疫吸附法

因國內尚未有 ASGV 及 ACLSV 之病毒抗血清，故由國外引進梨黃化葉斑病毒 (ACLSV)、梨莖凹陷病毒 (ASGV) 之 ELISA 套組 (Bioreba Company, Switzerland)，以 DAS-ELISA⁽⁴⁾ 進行檢測。首先將 ELISA 套組中之抗體與 coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 0.02% NaN₃, pH 9.6) 以 1:1000 的稀釋倍數稀釋後，取 100 μ l 加到微孔盤 (polystyrene) 的各個孔洞內，上蓋之後，置於 37°C 1 小時。將抗體甩掉後，以 PBST (137 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20, 2.7 mM KCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4) 進行沖洗三次；再將新鮮之欲檢測梨葉片或梨花苞與萃取緩衝液 (extraction buffer) (35 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2% PVP (M.W. 24000), 0.05% Tween 20, 2.7 mM KCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4) 作 1:10-1:20 的比例混合，以研钵研磨後，將粗汁液加至於微量離心管內，以 3000 rpm (Heraeus instruments, Megafuge 1.0R) 離心 5 分鐘，取上清液 100 μ l 加到微孔盤的孔洞內，上蓋之後，置於 37°C 1 小時後，將組織粗汁液甩掉，以 PBST 進行沖洗三次；將抗血清套組內的具酵素連結之二次抗體與 conjugate buffer [35 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2% PVP (M.W. 24,000), 0.05% Tween 20, 0.2% BSA, 1 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 2.7 mM KCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4] 以 1:1000 的稀釋倍數稀釋後，取 100 μ l 加到微孔盤的各孔洞內，上蓋之後，置於 37°C 1 小時後，將二次抗體甩掉，以 PBST 進行沖洗三次；最後將受質藥劑 p-nitrophenyl phosphate (p-NPP, Sigma) 以受質緩衝液 (substrate buffer) (9.7% Diethanolamine, 0.02% NaN₃, pH 9.8) 製備成 1 mg/mL 之受質溶液，取 100 μ l 加到微孔盤的各孔洞內，上蓋之後，置於室溫且不受光照的條件下進行呈色反應 2 分鐘至 1 小時。以微孔盤讀值機，利用單一波長 405 nm 的光源進行呈色判讀，而其呈色讀值與正反應及負反應之對照組進行比較，以讀值超過負反應對照組 2 倍以上者視爲正反應。

結 果

ASGV 及 ACLSV RT-PCR 偵測技術之建立

將田間採集到疑似受病毒感染之梨病葉萃取出總量 RNA 後，爲證明預建立之 RT-PCR 技術的可行性，及了解造成橫山梨葉部疑似病毒感染病徵之可能性，利用依

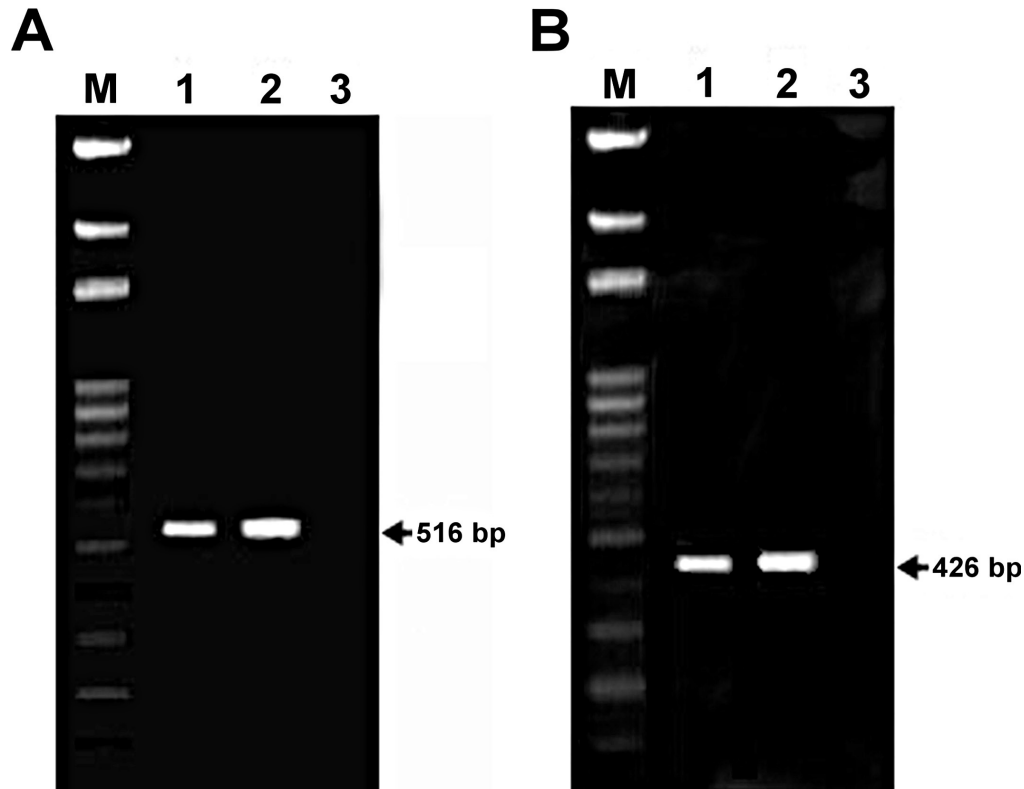
ASGV 鞘蛋白基因核苷酸序列及 ACLSV 依 ORF1 基因核苷酸序列所設計之引子對 (圖一及圖二) 以進行 RT-PCR 分析，若受此二病毒感染，預期 ASGV 於 RT-PCR 增幅後可獲得一 516 bp 之 DNA 產物，而 ACLSV 於 RT-PCR 增幅後可獲得一 426 bp 之 DNA 產物。採樣樣品經 RT-PCR 後之電泳分析結果，發現以台灣主要梨栽培區採集之梨病葉，分別可獲得與預期 ASGV 增幅後分子量大小相符 516 bp (圖三A) 及 ACLSV 爲 426 bp 之 DNA 產物 (圖三B)，而各組於未具病毒病徵之對照植物所抽取之總量 RNA 增幅後，則未獲得任何類似產物。進一步以上述設計之 ASGV 及 ACLSV 引子對，進行田間定點採樣測試，於東勢一疑似梨衰弱病田，分別於不同時期對 21 株疑似梨衰弱病株進行採樣測試，結果發現 9 株受 ASGV 感染，5 株受 ACLSV 感染，在這 14 株中有兩株爲複合感染 ASGV 及 ACLSV，此結果顯示，利用針對 ASGV 及 ACLSV 設計的引子對所建立之 RT-PCR 偵測已可實際應用於田間偵測，並可於不同季節準確偵測到此二病毒的存在。

ASGV 及 ACLSV 部分基因體之選殖及核酸序列定序與分析

爲了證實 RT-PCR 所得之核酸片段爲 ASGV 及 ACLSV 基因體核酸之一部份，因此進一步進行 RT-PCR 產物之基因選殖。將部份 RT-PCR 反應所增幅之核酸片段經 TOPO TA 選殖套組選殖，選殖出之選殖株核酸片段經解序後，與基因庫上已發表之病毒序列進行搜尋比對 (NCBI, BLAST program)。經判讀爲 ASGV 及 ACLSV 相關序列後，共得到 5 個 ASGV 台灣分離株之部分鞘蛋白核酸序列 (圖四) 及 1 個 ACLSV 台灣分離株之部分 ORF 1 核酸序列 (圖五)，將 ASGV 部分鞘蛋白基因及 ACLSV 部分 ORF1 基因序列分別與國外已知 2 個 ASGV 分離株^(15,18) (圖四)，及 4 個 ACLSV 分離株^(6,7,14) (圖五) 分別進行核酸序列分析 (Clustal algorithm of MegAlign program of DNASTAR software)。ASGV 部分鞘蛋白基因序列與國外已發表過之 ASGV 序列比對後，具 90.3-98.4% 之核酸相同度 (identity)，及 95.8-98.8% 之胺基酸序列相同度 (表一)，而台灣 5 個分離株間部分鞘蛋白基因序列比對後之序列相同度爲 90.9-99.6%，胺基酸序列相同度爲 95.8-98.8% (表一)；ACLSV 之部分 ORF 1 基因序列與國外已發表過之 ACLSV 序列比對後，核酸序列相同度爲 77.7-85.2%，胺基酸序列相同度爲 92.2-99.3% (表二)。

進口梨接穗之檢測

爲了進一步測試所建立的 ASGV 及 ACLSV RT-PCR 偵測技術也可實際應用於進口梨接穗對此二病毒之偵測，於民國 90 年 10 月至 91 年 1 月期間，利用行政院農業委員會動植物防疫檢疫局新竹分局及台中分局所抽樣之日本進



圖三、利用(A) ASGV 鞘蛋白基因區域及(B) ACLSV ORF 1 基因區域設計引子對所 RT-PCR 增幅之核酸片段。

Fig. 3. Electrophoretic analysis of RT-PCR amplified products. (A), A product of 516 bp was amplified from total RNA extracted from pear leaves by RT-PCR with primers FJJ2001-23/FJJ2001-24 and (B), a product of 426 bp was amplified with primers FJJ2001-25/FJJ2001-26. Lanes 1 and 2, samples from pear leaves showing virus-infected symptoms from fields; lane 3, leaf tissues from uninfected pear; and lane M, Gen-100 DNA ladder.

口梨接穗，以本研究所建立之 RT-PCR 偵測技術並配合 ASGV 及 ACLSV ELISA 偵測套組進行檢測。以 ELISA 二重複，並以 ASGV 所設計之引子對 FJJ2001-23/FJJ2001-24 及 ACLSV 所設計之引子對 FJJ2001-25/FJJ2001-26 進行 RT-PCR 二重複增幅測試，在總數 359 個檢測樣品中，其中有 3 個來自行政院農委會動物植物防疫檢疫局台中港務分局所採樣之接穗樣品，以 ASGV 抗血清偵測下為正反應 (表三)，而以 RT-PCR 偵測亦可成功放大出 516 bp 大小之 ASGV 核酸片段 (圖六)。

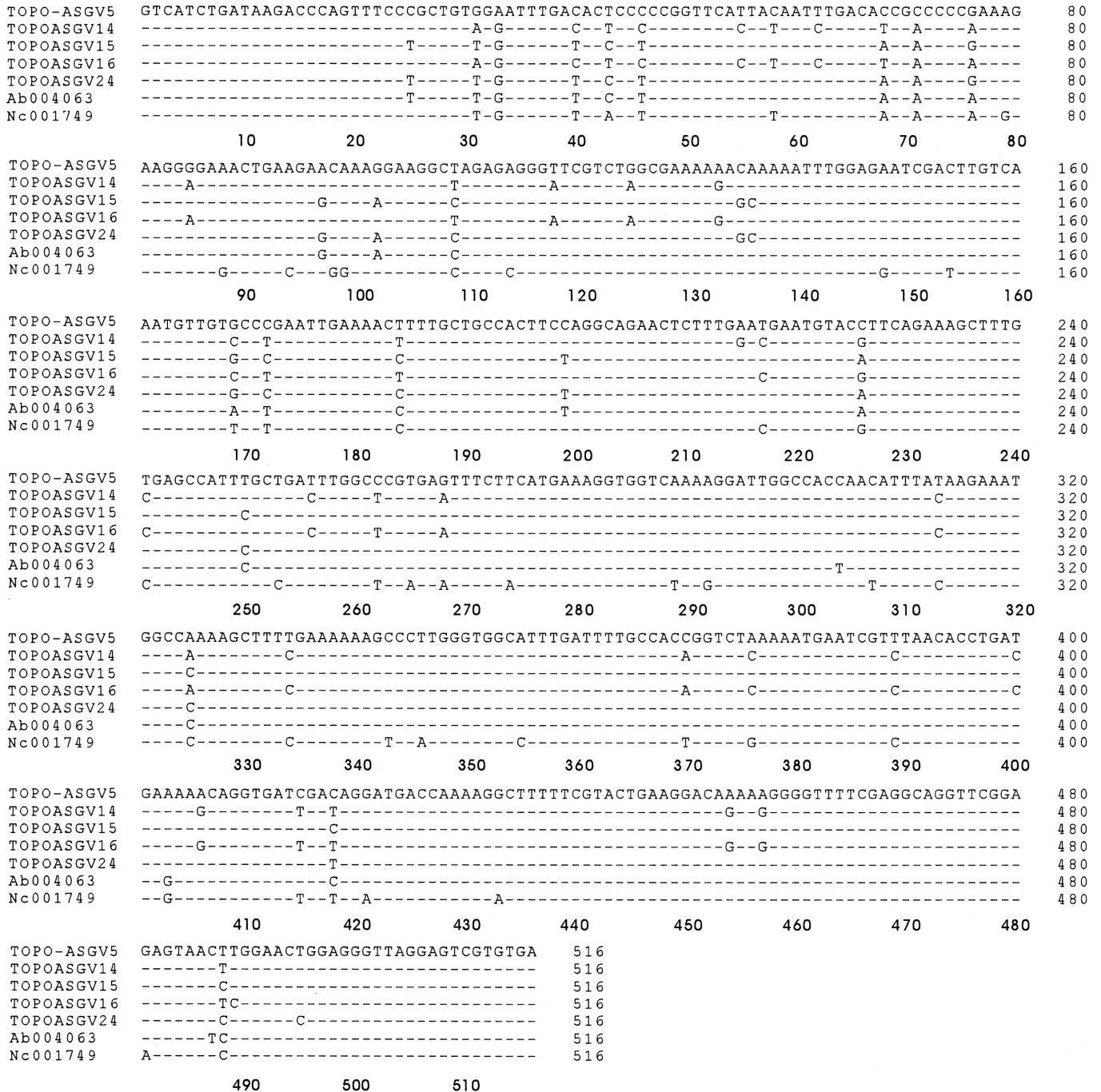
討 論

蘋果莖凹陷病毒 (ASGV) 和蘋果黃化葉斑病毒 (ACLSV) 為影響蘋果及梨產業上重要之病毒⁽¹⁰⁾。雖然台灣每年進口大量梨接穗嫁接至橫山梨上以產生高價值之溫帶梨，但至目前為止，台灣並沒有任何有關梨及蘋果病毒的相關研究報告，為了建立台灣梨病毒病害研究的第一步，本研究利用由基因庫搜尋比對所設計出針對 ASGV 及 ACLSV 偵測之兩組引子對建立了對此二病毒的 RT-PCR 偵測技術，且將 RT-PCR 增幅之產物選殖並定序後，所得之 ASGV 部分鞘蛋白基因及 ACLSV 之部分 ORF 1 基因序列

再進一步與已發表之病毒序列進行比對。經序列比對分析結果顯示本研究所建立之 RT-PCR 偵測技術可專一性偵測 ASGV 及 ACLSV，此外本研究亦首次發現台灣主要栽培之梨樹品種橫山梨已受 ASGV 及 ACLSV 此二病毒感染。

本研究所選殖之台灣 ASGV 及 ACLSV 分離株與國外已發表之病毒分離株之間的序列相同度並非很高 (表一及表二)，加上亦可從進口接穗上測得 ASGV 的存在 (表三及圖六)，因此並不代表所選殖之 ASGV 及 ACLSV 即為台灣之本土型病毒。台灣自 60 年代即開始採用嫁接梨技術以提高梨產業收益，然而至 2001 年之前對此二種病毒病害仍未有健全之檢測系統及研究，因此是否為十九世紀末引進橫山梨後⁽²⁾ 即帶入病毒而發展為本土型病害，或因近年來自國外大量進口梨接穗後引進此二病毒，致使病毒於本省梨樹上繁殖發展，再經由不同分離株間的重組，而導致序列相同度間之差異性；亦或因地域性區隔變化導致病毒間各自演化而有所不同。因此由台灣發現之 ASGV 及 ACLSV 兩病毒與國外病毒間之親源性將待大量收集台灣的分離株後以進一步釐清。

目前所選殖出之台灣 ASGV 及 ACLSV 分離株，將進一步用來設計適合台灣本省 ASGV 及 ACLSV 分離株之專

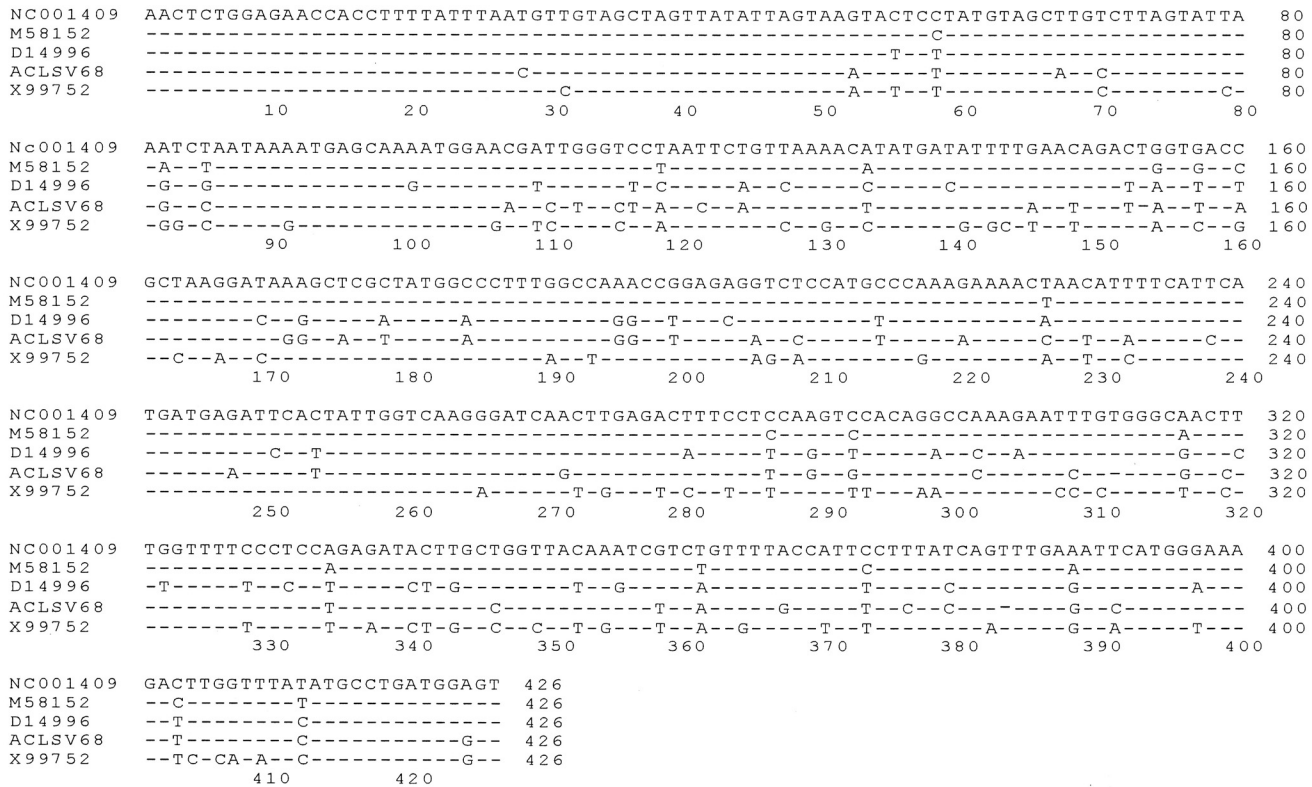


圖四、台灣分離株與國外已發表之ASGV 部份鞘蛋白基因核酸序列比較。

Fig. 4. Comparison of the nucleotide sequences of the partial coat protein genes of five Taiwanese ASGV isolates (from Dong-Shi) with those of other ASGV isolates available in Genbank. AB004063 and NC001749 are the Genbank accession numbers.

一性引子對，藉以發展專一性 RT-PCR 偵測技術平台，並應用於梨產業界中以建立精準之 ASGV 及 ACLSV 病毒監控系統。除此之外，利用建立之 RT-PCR 技術於台灣梨園中進行檢測，配合田間觀察紀錄，以利於探討當台灣栽培梨樹品種感染此二病毒後，將產生何種形式之病徵，使其方便於田間進行初步的檢定判斷。且確認病毒發展形式後，更可進一步將病毒分離純化，以便對此二病毒作更深入的研究。

總而言之，本研究已經建立台灣 ASGV 及 ACLSV 的 RT-PCR 偵測技術並已實際應用於進口梨接穗之檢測工作，在此我們為因應進口梨接穗檢疫之監測系統，除以所建立之 RT-PCR 技術加以偵測外，進一步將建立一套快速且專一之 ELISA 檢測系統應用於大量樣品檢測上，除操作簡便、靈敏度高外、更因其檢測流程所需耗費之時間短，並搭配 RT-PCR 技術進一步加以確認，使不耽誤進口接穗進入田間高接之時間。因此未來將針對 ASGV 及



圖五、台灣分離株與國外已發表之ACLSV 部份ORF1 基因核酸序列比較。

Fig. 5. Comparison of the nucleotide sequences of the partial ORF1 gene regions of ACLSV-68 (from Dong-Shi) with those of other ACLSV isolates available in Genbank. D14996, M58152, NC001409, and X99752 are the Genbank accession numbers.

表一、台灣五個分離株及國外已發表ASGV 部份鞘蛋白基因序列之比較

Table 1. Nucleotide and amino acid identities (%) of the partial coat protein regions of five Taiwanese ASGV isolates with those of other ASGV isolates available in Genbank

Virus isolate	A ¹	B	C	D	E	F	G
A	100 ² 100 ³	91.1 95.8	99.6 98.8	90.9 95.8	95.6 95.8	98.0 98.2	91.1 95.8
B		100	91.1 96.4	99.6 98.2	93.5 96.4	91.5 97.0	91.1 95.8
C			100	90.9 96.4	96.0 96.4	98.4 98.8	91.1 96.4
D				100	93.3 96.4	91.3 97.0	91.1 95.8
E					100	95.2 97.0	90.3 95.8
F						100	91.7
G							100 100

¹ ASGV isolates and their GenBank accession numbers: A=Topo-ASGV-24, B= Topo-ASGV-16, C=Topo-ASGV-15, D=Topo-ASGV-14, E=Topo-ASGV-5, F=ASGV (AB004063), and G=ASGV (NC001749).

² nucleotide identity (%)

³ amino acid identity (%)

表二、台灣分離株及國外已發表ACLSV 部份ORF1 序列之比較
Table 2. Nucleotide and amino acid identities (%) of the partial ORF1 gene regions of ACLSV-68 with those of other ACLSV isolates available in Genbank

Virus isolate	A ¹	B	C	D	E
A	100 ² 100 ³	85.2 99.3	85.0 97.9	85.0 97.9	77.7 92.2
B		100	86.4 98.6	86.4 98.6	78.2 92.9
C			100	100	78.6
D				100	94.3
E					100 100

¹ The partial ORF1 region of ACLSV viral genome and their GenBank accession numbers: A=Topo-ACLSV-68, B=ACLSV (D14996), C=ACLSV (M58152), D=ACLSV (NC001409), and E=ACLSV(X99752)

² nucleotide identity (%)

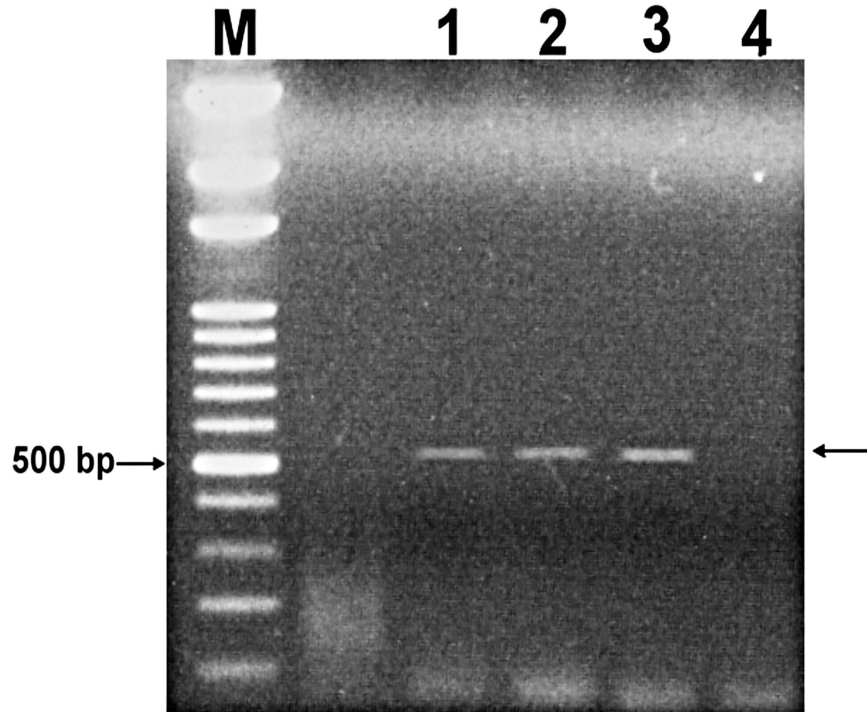
³ amino acid identity (%)

表三、以RT-PCR 及 ELISA 技術檢測進口梨接穗上 ASGV 及 ACLSV 之結果

Table 3. Detection of ASGV and ACLSV in imported pear scions by RT-PCR and ELISA

Source ¹	No. samples tested	ASGV detected		ACLSV detected	
		ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR
Hsin-Chu	185	0	0	0	0
Taichung	174	3	3	0	0

¹ The imported pear scions samples were provided by Taichung and Hsin-Chu Branch Offices, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine.



圖六、日本進口梨接穗 ASGV 之 RT-PCR 檢測。

Fig. 6. Detection of ASGV in pear scions imported from Japan. A product of 516 bp was amplified from total RNA extracted from imported pear scions with primers FJJ2001-23/FJJ2001-24. Lanes 1-3, total RNA from imported pear scions; lane 4, leaf tissues from uninfected pear; and lane M, Gen-100 DNA ladder.

ACLSV 之全長度鞘蛋白基因區域設計引子對，以增幅出鞘蛋白基因後進行基因選殖，並於細菌蛋白表現系統中表現其鞘蛋白以為製備生產血清之用，為將來檢疫制度上添加一利器。

此外我們亦利用本研究中以針對 ASGV 及 ACLSV 設計的引子對所建立之 RT-PCR 技術，探討台灣梨疑似衰弱病株中此二病毒感染的情形，令我們驚訝的在所偵測的 21 株顯現梨衰弱病徵之病株上，有高比率(21 株中有 14 株)偵測到 ASGV 或 ACLSV，而此 14 株中有 2 株為此二病毒之複合感染。雖然已知國外梨衰弱病是由植物菌質體(phytoplasma)所引起⁽⁸⁾，但為何台灣疑似梨衰弱病株竟有此高比例的 ASGV 或 ACLSV 病毒感染則需進一步的研究加以探討。

謝 辭

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局計畫經費補助，特誌謝忱。

引用文獻

1. 行政院農業委員會中部辦公室. 2001. 八十九年農業統計年報. 行政院農業委員會出版. 426pp。

2. 林嘉興、廖萬正、林信山、林長仁. 1991. 梨栽培之回顧與展望. p. 379-296. 台灣果樹枝生產及研究發展研討會專刊。
3. 黃曾泉. 1993. *Pyrus* 梨屬. 台灣植物誌. 台灣植物誌第二版編輯委員會出版. 台北 1084 pp。
4. Clark, M.F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
5. Dunez, J., Marenaud, D., and Delbos, R. 1975. Bark split disease of prune trees and its association with strains of chlorotic leaf spot. *Acta Hort.* 44:81-91.
6. German-Retana, S., Bergey, B., Delbos, R. P., Candresse, T., and Dunez, J. 1997. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* (ACLSV). *Arch. Virol.* 142:833-841.
7. German-Retana, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J. C., Pernollet, J. C., and Dunez, J. 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of *Apple chlorotic leaf spot closterovirus*. *Virology* 179:104-112.
8. Hibino, H., and Schneider, H. 1970. Mycoplasma like bodies in sieve tubes of pear trees affected with pear decline. *Phytopathology* 60:499-501.
9. Jan, F.-J. 1998. Roles of nontarget DNA and viral gene length in influencing multi-virus resistance through

- homology-dependent gene silencing. ph. D. Dissertation, Department of Plant Pathology, Cornell University.
10. Jones, A. L., and Aldwinckle, H. S. 1990. Compendium of Apple and Pear Diseases. APS Press, Minnesota, 100pp.
 11. Napoli, C. C. L., and Jorgenson, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
 12. Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3th ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
 13. Sanger F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F., and Petersen, G. B. 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.* 162:729-773.
 14. Sato, K., Yoshikawa, N., and Takahashi, T. 1993. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *J. Gen. Virol.* 74:1927-1931.
 15. Terauchi, H., Magome, H., Yoshikawa, N., and Takahashi, T. 1997. Nucleotide sequence of the genome of *Apple stem grooving capillovirus* isolate and construction of an infectious cDNA clone of the genome containing a cauliflower mosaic virus 35S RNA. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63:432-436.
 16. van der Meer, F. A. 1983. Hypersensitivity of woody indicators for apple stem grooving virus. *Acta Hort.* 130:133-140.
 17. Yanase, H. 1982. Back transmission of *Apple stem grooving virus* to apple seedlings and induction of symptoms of apple topworking disease in Mitsuba Kaido (*Malus sieboldii*) and Kobano Zumi (*Malus sieboldii* var. *arborescens*) rootstocks. *Acta Hort.* 130:117-122
 18. Yoshikawa, N., Sasaki, E., Kato, M., and Takahashi, T. 1992. The nucleotide sequence of *Apple stem grooving capillovirus* genome. *Virology* 191:98-105.

ABSTRACT

Jan, F. J.^{1,4}, Wu, Z. B.¹, Kuo, A. J.², Zheng, Y. X.¹, Chang, H. H.¹, Su, C. C.³, and Yang, Y. S.² 2003. Detection of *Apple chlorotic leaf spot and Apple stem grooving viruses* by the method of reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Pathol. Bull.* 12:10-18. (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ² Department of Horticulture, National Chung Hsing University; ³ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan; ⁴ Corresponding author, E-mail: fjjan@nchu.edu.tw, Fax: +886-4-22854145)

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) are economically important pathogens for commercial rosaceous fruit trees. Since there are no official reports regarding the two viruses infecting pear in Taiwan and lots of pear scions are imported from Japan to Taiwan for producing high quality pear each year, development of diagnostic approaches for the detection of the two viruses becomes important. Degenerate primers for the partial coat protein (CP) gene of ASGV and the partial replicase (ORF 1) gene of ACLSV were designed for detecting these viruses using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The partial CP gene of ASGV and the partial ORF1 gene of ACLSV amplified by RT-PCR were cloned and sequenced. Comparison of the 516-nt partial CP region with those of two ASGV isolates from GenBank revealed 90.3-98.4% nucleotide identity and 95.8-98.8% amino acid identity. Comparison of the 426-nt partial ORF1 region with those of four ACLSV isolates from GenBank revealed 77.7-85.2% nucleotide identity and 92.2-99.3% amino acid identity. The RT-PCR method was also used to investigate the presence of these viruses in the pear plants with pear decline-like symptoms. Fourteen of twenty-one tested plants were detected to be infected with ASGV or ACLSV, among them two samples were found to have mixed infection with both viruses. In addition, the RT-PCR method developed in this study has also been used to detect ASGV and ACLSV in pear scions imported from Japan during October 2001 to January 2002. Three of the 359 tested pear scions were detected to be infected with ASGV. Taken together, the RT-PCR assay described is a reliable, rapid and sensitive method for detection of these two viruses in leaves and scions of pear. Furthermore, this is the first report of *Pyrus pyrifolia* var. *Hengshen*, the dominant pear cultivar in Taiwan, as a natural host of ASGV and ACLSV.

Key words: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV, *Apple stem grooving virus*, ASGV, RT-PCR, pear scion