康乃馨上洋桔梗壞疽病毒之分離與鑑定

陳慶忠1.4 陳煜焜2 柯文華1 徐惠迪3

1 彰化縣大村鄉 行政院農業委員會 台中區農業改良場

2 國立中興大學 植物病理學系

3 U.S. Department of Agriculture, Beltsville Agricultural Research Center, Floral and Nursery Plants Research Unit, Beltsville, MD20705-2350

4 聯絡作者,電子郵件: Chencc@tdais.gov.tw; 傳真: 04-8521140

接受日期:民國91年7月20日

摘要

陳慶忠、陳煜焜、柯文華、徐惠迪. 2002. 康乃馨上洋桔梗壞疽病毒之分離與鑑定. 植病會刊11:137-146.

於彰化縣田尾鄉及永靖鄉栽種進口之康乃馨(Dianthus caryophyllus L.) 雜交品系 "小可愛(Kooij Echo kgr, Holland)"發現一種類似由病毒引起葉片產生淡黃色斑點病徵之植珠。病徵通常於生育中、後期之植株的上方葉片出現許多淡黃色斑點,隨病勢進展許多鄰近斑點融合成斑塊,呈黃色之組織逐漸轉化為壞疽,終致全葉枯萎。罹病葉片粗汁液及超薄切片經以電子顯微鏡觀察到一種直徑約32-33 nm 之球形病毒,於純化之試料中亦可觀察到類似之病毒顆粒。雙向免疫擴散反應及酵素聯結免疫分析均顯示上述康乃馨所分離之病毒(以下稱康乃馨分離株)的病組織粗汁液或純化病毒與本研究室過去在洋桔梗上所分離之洋桔梗壞疽病毒(Lisianthus necrosis virus, LNV)兔子抗血清產生專一性反應。酵素連結免疫反應分析亦顯示本試驗以康乃馨分離株純化試料製備之老鼠單元抗體與病組織粗汁液抗原產生專一性反應。電泳分析(SDS-polyacrylamide)康乃馨分離株得到一分子量約38 kDa 的鞘蛋白與LNV 之鞘蛋白分子量相似。根據以上證據,本試驗由康乃馨所分離之病毒應屬於LNV 之一系統。康乃馨分離株可以系統性感染多種寄主植物,這些寄主並非LNV 日本分離株及LNV 台灣洋桔梗分離株的寄主植物或僅是產生局部病斑的寄主植物,顯示康乃馨病毒為LNV 之一致病性較強之病毒系統(strain),LNV 能感染康乃馨為首次記錄。

關鍵詞:康乃馨、洋桔梗壞疽病毒、分離、鑑定

前 言

番石竹 (Dianthus caryophyllus L.) 為石竹科 (Caryophyllaceae),石竹屬(Dianthus)之多年生草本植物。 英名 carnation,中名康乃馨,俗名香石竹,主要分成三群 即標準型或單花型(standard or single flower type)、多花型 或小花型(spray or miniature)及迷你型(mini-carnation),第 三型多為種間雜交系⁽¹²⁾。彰化縣境花農為應五月份母親 節的市場需求,近年部份花農改種植較耐熱之迷你型康乃 馨雜交品系 "小可愛(Kooij Echo kgr, Holland)",其種苗 多由荷蘭進口。一般於八、九月種植成苗,於翌年二月開 始切花。1995年四、五月間於彰化縣田尾鄉及永靖鄉發 現部份田間植株上方葉片產生淡黃色斑點,逐漸擴增致全 葉性枯萎,植株生長勢衰弱,嚴重影響抽花數、花的大小 及花形等,對切花量及品質有嚴重影響,而導致原為多年 生之草本花卉植物於栽培一期後即被迫廢園。經採集病葉 組織進行陰染、電子顯微鏡鏡檢可觀察到大量直徑約32-33 nm 之球形病毒顆粒。其病葉粗汁液與胡瓜嵌紋病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) 抗血清⁽³⁾進行免疫擴散反 應並無沈澱反應產生,但與洋桔梗壞疽病毒(Lisianthus necrosis necrovirus, LNV, Tombusviridae) 抗血清⁽²⁾則有明 顯正反應。根據文獻記載可以感染康乃馨之球形病毒有 Carnation cryptic virus, CCV (Partitiviridae), Carnation Italian ringspot virus, CIRV (Tombusviridae), Carnation mottle virus, CarMV (Tombusviridae), Carnation mottle virus, CarMV (Tombusviridae), Carnation virus, CRSV (Tombusviridae) 及 Carnation ringspot virus, CRSV (Tombusviridae) 等七種^(7,12,13,15,16),其中並未 包括LNV。而迄今LNV 在田間已知之自然寄主僅止於洋 桔梗(Eustoma russellianum (Don.) Griseb) 亦未包含康乃馨 ^(2,9,10)。本研究後續經由一系列之特性比對,確定此分離自 迷你康乃馨之病毒與過去得自洋桔梗之LNV 分離株(LNV lisianthus isolate, LNV-L) 在理化與血清學之特性上幾近吻 合,應屬相同病毒之不同分離株,故稱其為 LNV carnation isolate (LNV-C)。本文乃敘明LNV-C 在康乃馨上 所造成之病徵及其各項生物、理化與血清學等特性,並探 討其與已知LNV 分離株間之類緣關係。

材料與方法

病毒之分離及保存

1995年5月在彰化縣永靖鄉田間康乃馨"小可愛" 品系(Kooij Echo kgr, Holland)(以下稱康乃馨)上採集產生 淡黃色斑點之葉片,以2倍量(W/V)磷酸鉀緩衝液(0.1 M, potassium phosphate buffer, pH 7.0,內含0.01 M Na₂SO₃)磨 碎,棉花棒沾病葉粗汁液摩擦接種於撒有400目金鋼砂之 葵藜(*Chenopodium quinoa* Willd.),約二日後產生壞疽斑 點。經三次單斑分離之病毒,再接種到葵藜保存,作為本 試驗供試材料。

寄主範圍測定

取機械接種LNV-C 之初發病葵藜 (C. quinoa) 葉片, 依前述方法接種莧科 (Amaranthaceae)、夾竹桃科 (Apocynaceae)、鳳仙花科 (Balsaminaceae) 番木瓜科 (Caricaceae)、石竹科 (Caryophyllaceae)、藜科 (Chenopodiaceae)、菊科 (Compositae)、十字花科 (Cruciferae)、葫蘆科 (Cucurbitaceae)、龍 膽科 (Gentianaceae)、豆科 (Leguminosae)、百合科 (Liliaceae)、 紫茉莉科 (Nyctaginaceae)、薔薇科 (Rosaceae) 及茄科 (Solanaceae)等15科53 種植物,於溫控玻璃室(25-28°C) 內觀察病徵,於連續觀察四週後採取接種葉進行間接酵素 聯結免疫分析 (indirect ELISA),以確認病毒之感染。

生體外安定性測定

以0.1 M 磷酸鉀緩衝液(potassium phosphate buffer, pH 7.0) 抽取接種LNV-C 之葵藜葉片粗汁液做 10 倍系列稀 釋,機械接種於葵藜以測定病毒之稀釋臨界點(dilution end point)。另以稀釋10 倍之LNV-C 粗汁液測定其耐熱性 (thermal inactivation point) 及生體外活性(longevity in vitro)。

病毒之純化

LNV-C 之純化係依 Iwaki *et al*⁽⁹⁾ 之方法略加修改進行。罹病 葵藜病葉以磷酸鉀緩衝液(0.5 M potassium phosphate buffer,內含1%2-mecaptoethanol,pH7.5)萃取, 濾液以氯仿(choroform)及四氯化碳(CCl₄)凈化,並以8% PEG 6000(含0.3 M NaCl)沈降,加入2% Triton X-100 攪 拌淨化、離心後,取上層液置於20% (W/V) 蔗糖溶液墊層 上離心。所得沉降物製成懸浮液置於10-40% 蔗糖密度梯 度離心3小時 (Hitachi RPS 40T, 25,000 rpm),吸起沈降 帶、經高速離心沈降後,懸浮沈降物即得純化病毒。

電子顯微鏡觀察

陰染法 (negative stain): 罹病葵藜組織粗汁液與0.1% bacitracin (1:1) 混合,依Christie *et al.* (1987)⁽⁴⁾ 之方法以銅 網吸附前述混合液,再以2% 醋酸鈾 (uranyl acetate) 染 色。純化之病毒懸浮液經2% 甲醛(formaldehyde) 固定 後,依前述方法染色,以電子顯微鏡(JEM-200CX, JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) 鏡檢觀察病毒顆粒之形態,並拍照測量 100 顆病毒顆粒之直徑,計算病毒顆粒之平均大小。

超薄切片法(extra thin section):經機械接種LNV-C 而發病之洋桔梗、葵藜、菸草(Nicotiana benthamiana Domin)、大理花、五彩石竹及辣椒等葉片組織,分別以2% 戊二醛(glutaraldehyde)及1%四氧化鋨(osmium tetroxide)做前、後固定,再以酒精系列脫水及LR White 樹脂滲透包埋後,於超薄切片機(Reichert ultracut S)切取60-70 nm 厚度的切片。經2% 醋酸鈾和檸檬酸鉛染色後以電子顯微鏡觀察病組織之變化。

病毒外鞘蛋白分子量測定

病毒外鞘蛋白分子量測定係依照Laemmli (1970)⁽¹¹⁾之 SDS-PAGE 方法進行。純化之 LNV-C 病毒加入 degrading buffer (62.5mM Tris-HCl buffer, pH 6.8, 10% Ficoll, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 12.5 ppm bromophenol blue) 於 65℃ 加熱10 分鐘後進行膠體電泳分析。

血清學試驗

本試驗所使用之多元抗體包括洋桔梗壞疽病毒台灣分離株(LNV-L)多元抗體係本實驗室所製備⁽²⁾,洋桔梗壞疽病毒日本分離株(LNV-J)多元抗體係由Dr. M. Kameya-Iwaki (Yamaguchi University, Japan)所贈予。LNV-C多元抗體之製備係將純化自罹病葵藜之病毒,經電泳分離而得之病毒外鞘蛋白(38 kDa)注射紐西蘭白兔,每週注射一次(1 mg/ml),連續注射四週,第五週起進行耳朵靜脈採血,所得抗血清保存於-40°C備用。

LNV-C 單元抗體係參照 Halk *et al.*⁽⁶⁾ 及 Hsu & Lawson ⁽⁸⁾ 之方法進行製備。以純化之康乃馨病毒做為免疫抗原。 小白鼠採用腹腔注射之免疫方式。利用間接酵素連結免疫 分析篩選具分泌抗體能力之融合瘤細胞株,再經單株化 (single cell cloning) 後擴大培養,所得培養液即為單元抗 體(monoclonal antibody) 來源。

雙向免疫擴散反應

用 PBS (15 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl) 配製 0.8% (w/v) 瓊脂溶液,取 15 ml 置 於培養 皿使成瓊脂 平板,平板上以直徑 7 mm 之打孔器打 洞(中央一,周圍六),洞穴距 4.5 mm。每穴分別注入 50 µ1 抗原(純化之病毒,10 µg/µ1 及罹病洋桔梗葉片粗汁 液),以健康洋桔梗葉片粗汁液供為對照,中央穴則加入 LNV-C 抗血清,於室溫下進行反應。

酵素連結免疫分析

間接酵素連結免疫分析 (indirect ELISA) 係依 Lommel et al. (1982)⁽¹⁴⁾ 之方法進行。供試植物葉片依試驗目的分 別以 coating buffer (1000 ml H₂O 中含有1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃, pH 9.6) 研磨稀釋, 取 200 µ1 置入微量盤之孔穴中,於37℃靜置2.5小時後用PBST (1000 ml H₂O 中含有 8 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 2.9 g Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.2 g KCl, 0.2 g NaN₃ , 0.5 ml Tween-20, pH 7.4) 清洗3 次。加入以 conjugate buffer (1000 ml PBST 內含 2% PVP-40 (w/v), 0.2% ovalbunin (w/v)) 稀釋 1000 倍 之LNV 兔子抗血清,於37℃下靜置2小時,用PBST清 洗3次,再加入以conjugate buffer 稀釋5000 倍之鹼性磷酸 酵素標示之山羊抗兔子免疫球蛋白 (goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Jackson ImmunoRsearch Lab. Inc., USA)。三層酵素連結免疫分析(triple-antibody sandwich ELISA, TAS-ELISA) 係依據 Hsu and Lawson⁽⁸⁾ 之方法進行,依序加入LNV 兔子抗血清球蛋白(1: 2000)、3% bovine serum albumim (BSA)、抗原、LNV 老 鼠單元抗體細胞培養液(1:8),最後加入以結合緩衝液 (conjugate buffer) 稀釋 1000 倍之鹼性磷酸酵素標示之山羊 抗老鼠免疫球蛋白 (goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate, Jackson ImmunoRsearch Lab. Inc., USA)。兩種方法最後均於 37℃ 靜置 2 小時或 4℃ 過夜, 水洗後,每穴加入 200 µ1 以 substrate buffer (97 ml diethanolamine, 800 ml H₂O, 0.16 g NaN₃, pH 9.8) 配製之酵 素基質 (1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate, disodium, Sigma Chemical, USA) 試液反應 20-60 分鐘,每穴再加入 50 µ1 之3M NaOH 停止反應,並以 ELISA 測讀儀 (Bio-Tek Instruments, Burlington, VT, USA) 讀取波長 405 nm 之吸收 值。以健康對照A405之讀值的3倍為正反應之判定依據。

結 果

病徵及寄主範圍

田間觀察到之康乃馨 "小可愛" 罹病株通常為生育 中、後期較老的植株,罹病株上方葉片出現許多淡黃色小 斑點(圖一A),有時許多鄰近斑點融合成斑塊,呈黃色之 組織逐漸轉化成壞疽,終致全葉枯萎。健康康乃馨接種 LNV-C 罹病葉片粗汁液或純化病毒懸浮液後 10-12 天亦出 現淡黃色小斑點(圖一B)。以罹病葵藜粗汁液機械接種15 科 53 種植物結果有 48 種植物被感染,其中產生系統性病 徵者有千日紅 (Gomphrena globosa L.)、西洋石竹 (Dianthus barbatus L.)、康乃馨"小可愛" (D. caryophyllus L.)、五彩石竹 (D. chinensis L.)、紅藜 (Chenopodium amaranticolor Coste & Reny)、葵藜 (C. quinoa Willd.)、萬 壽菊 (Tagetes erecta L.)、洋桔梗 (Lisianthus russellianus (Don.) Griseb)、甜椒 (Capsicum annuum L. var. Grossum Seudt.)、辣椒 (C. annuum L. Red pepper)、番茄 (Lycopersicum esculentum L. var. lycopersicum) 及菸草 (Nicotiana benthamina Domin.) 等 12 種,其主要徵狀為葉 片產生黃斑、壞疽斑點、葉面皺縮或全株性萎凋。呈非系 統性感染之植物有野莧 (Amaranthus viridis L.)、白莧 (A. mangostanus L.)、紅莧 (A. mangostanus form ruber)、日日 春 (Vinca roseus L.)、非洲鳳仙花 (Impatiens wallerana Hook.)、大理花 (Dahlia hybrid Hort.)、百日草 (Zinnia elegans Jacq.)、小白菜 (Brassica campestris L. ssp. Chinensis (L.) Mak.)、西瓜 (Citrullus lanatus (Thunb) Matsum et Nakai)、冬瓜 (Benincasa hispida (Thunb) Cogn.)、洋香瓜 (Cucumis melo L.)、刺角瓜 (C. metuliferus Vivaldi)、胡瓜(C. sativus L.)、絲瓜(Luffa aegyptiaca P. Mill. (Luffa cylindrica Roem.))、落花生 (Arachis hypogaea L.)、菜豆 (Phaseolus vulgaris L.)、豌豆 (Pisum sativum L.)、豇豆 (Vigna. unguiculata (L.) Walp.)、紅豆 (Vigna angularis (Willd.) Ohwi et Ohashi)、大豆 (Glycine max Merr.)、黑豆 (Vicia mungo (L.) Hepper var subtrilobota Fr.et Sav.)、綠豆 (V. radiata (L.) R.Wilcz.)、星辰花(Limonium sinuatum Mill.)、蔓陀蘿(Datura stramonium L.)、矮牽牛 (Petunia hybrida Hort.)、茄子(Solanum melongena L.)、龍 葵(S. nigrum L.)及菸草(Nicotiana tabacum Hicks、N. tabacum var. Vam-Hicks N. rustica L. N. tabacum cv. White Burley) 等31 種植物,這些植物通常在接種葉片產 生壞疽性斑點,但供試瓜類則多呈黃化斑駁病徵。而小葉 灰 藿 (Chenopodium album L.)、 菊花 (Chrysanthemum morifolium Ramat.)、番木瓜 (Carica papaya L.)、矮南瓜 (Cucurbita pepo var. melopepo (L.) Alef.)、玫瑰 (Rosa hybrida Hort.) 等5 種供試植物則無法為LNV-C所感染。

為比較 LNV-C 與 LNV-L 二病毒分離株之致病力的差 異性,本試驗以前述二病毒分離株分別接種葵藜後,將罹 病葵藜葉片粗汁液在相同環境條件下同時機械接種十二種 植物(表一)。機械接種時係接種供試植物除上方二新葉外 之其他中、下位葉片。結果 LNV-C 及 LNV-L 均可系統性 感染洋桔梗、蕃茄、菸草(*N. benthamiana*),但病徵之表 現似以接種 LNV-C 者較為嚴重。以洋桔梗為例,當接種



圖一、康乃馨分離株感染不同寄主植物引起之病徵。(A)田間康乃馨 "小可愛 "葉片產生黃化斑點。(B)機械接種康乃馨 "小可愛 "葉片產生黃化壞疽斑點。(C)機械接種五彩石竹:康乃馨分離株(右);洋桔梗壞疽病毒(左)。(D)機械接種洋桔 梗:康乃馨分離株(左);洋桔梗壞疽病毒(右)。

Fig. 1. Symptoms induced by caration isolate (LNV-C) and lisianthus isolate (LNV-L) of *Lisianthus necrosis virus*. (A) Symptoms on *Dianthus caryophyllus* (a hybrid mini-carnation, Kooij Echo kgr, Holland) showing light yellow spots on leaves in the field; (B) Symptoms induced by mechanical inoculation of LNV-C on *D. caryophyllus*; (C) Symptoms induced by LNV-C (left) and LNV-L (right) on *D. barbatus* by mechanical inoculation; (D) Symptoms induced by LNV-C (left) and LNV (right) on *Lisianthus russellianus*.

LNV-C 及LNV-L 時均產生黃化斑點或輪圈斑點,終致壞 疽,但接種 LNV-C 之葉片所產生之黃化或壞疽斑點明顯 較LNV-L 斑幅要大(圖一D)。LNV-C 可系統性感染紅藜、 葵藜、甜椒、辣椒 及千日紅等植物,其中紅藜、葵藜感 染後會引起全株性萎凋;而LNV-L 接種上述植物後則僅 呈非系統性感染,且主要產生黃化斑點或壞疽斑點病徵。 LNV-C 可系統性感染五彩石竹及萬壽菊,而LNV-L 則不 能感染(圖一C)。一般而言,二病毒分離株機械接種上述 供試植物後所產生之病徵乃以接種 LNV-C 者較LNV-L 者 嚴重,且接種至病徵出現所需潛伏期較短。

粗汁液之安定性

感染康乃馨分離株之葵藜葉片粗汁液稀釋至10⁻¹⁰仍 具有感染性,但10⁻¹¹則無。粗汁液於液態氮保存至3年半 時機械接種於葵藜仍具有致病性;於4℃保存至50天仍 具有感染性;於20℃保存至97天具有致病性但114天則 無;粗汁液加熱至100℃(10分鐘)仍具有致病性,100℃ 以上則未予測試。

病毒純化

經 10-40% 蔗糖密度梯度離心,在距液面約 4-5 cm 處

表一、洋桔梗壞疽病毒康乃馨分離株(LNV-C)與洋桔梗分離株(LNV-L)之寄主範圍比較

Test plants	LNV-C		LNV-L	
	Symptoms ¹ reaction	Systemic ² leaves	Symptoms ¹ reaction	Systemic ² leaves
C. quinoa (葵藜)	W	S	NS	Non-S
Capsicum annuum L. var.	YM, RS	S	NS	Non-S
Grossum Seudt. (甜椒)				
C. annuum L. Red pepper (辣椒)	CR, YM	S	YS	Non-S
Dianthus barbatus (五彩石竹)	YM, YS	S	_	_
Gomphrena globosa (千日紅)	NS	S	NS	Non-S
Lisianthus russellianus (洋桔梗)	YS, RS	S	YS, RS	S
Lycopersicum esculentum (番茄)	YS	S	NS	S
Nicotiana benthamiana (菸草)	CR, NS, YS	S	NS	S
Petunia hybrida (矮牽牛)	NS	Non-S	NS	Non-S
Phaseolus vulgaris (菜豆)	CR,YM	Non-S	NS	Non-S
Tagetes erecta (萬壽菊)	NS	S	—	—

Table 1. Comparisons of host range of two isolates of Lisianthus necrosis virus isolated from carnation (LNV-C) and Lisianthus (LNV-L)

¹ Abbreviations of symptoms: crinkle (CR), necrosis spot (NS), ring spot (RS), yellow mottle (YM), yellow spot (YS), wilt (W), no reaction (–).

^{2.} systemic infection (S), non-systemic infection (Non-S), no infection (-)

有一病毒帶,經吸取、沈降、懸浮後稀釋 50 倍之懸浮 液,以光電比色計掃描,分別在 260 nm 和 240 nm 出規最 高和最低吸收峰。A260/A280 的比值為 1.605 (取 5 次試驗 之平均值)。純化病毒之收量係參考胡瓜嵌紋病毒(CMV) 之定量標準 E (0.1%, 1 cm, 260=5)⁽⁵⁾,估計 100 g 葵藜病葉 之病毒純化收量約 22.05 mg。純化之病毒懸浮液機械接種 葵藜約經 2-3 天可出現局部壞疸斑點,接種康乃馨 "小可 愛"約於接種後 10-12 天出現淡黃化小斑點(圖一B)。

電子顯微鏡觀察

罹病葵藜葉片粗汁液或純化病毒懸浮液以2% 醋酸鈾 溶液陰染,於電子顯微鏡鏡檢均可觀察到直徑約32-33 nm 之球形病毒顆粒(圖二A, B, C),健康之葵藜粗汁液則無。 超薄切片罹病葵藜葉片於葉肉細胞內之原質體(proplastid) 可觀察到病毒顆粒聚集於基質(stroma)內(圖三A)。於罹 病葵藜葉片葉肉細胞之葉綠體,病毒顆粒呈結晶狀排列於 基質內(圖三B)。罹病菸草(N. benthamiana)葉片之葉肉細 胞內,可發現大量病毒顆粒分佈於細胞質中(圖三C)。有 時病毒顆粒並在上述細胞質內並聚集成染色較深之不定型 類似內含體構造(圖三D)。在罹病洋桔梗、大理花、五彩 石竹及辣椒之葉片組織內亦可觀察到類似之病毒顆粒或內 含體之構造(未圖示)。

病毒外鞘蛋白分子量

利用 SDS-polyacrylamide 膠體電泳分析結果顯示 LNV-C 與LNV-L 之外鞘蛋白具有相同之電泳移動距離, 估算分子量約38 kDa (圖四)。

雙向免疫擴散反應

雙向免疫反應試驗顯示 LNV-C 抗血清與 LNV-C 及 LNV-L 之純化病毒及粗汁液抗原均產生沈澱反應且沈降帶 交接處呈平滑狀(圖五),顯示兩病毒在血清學特性上幾近 相同無法區別。

酵素聯結免疫反應

為測定本試驗製備之LNV-C單元抗體細胞培養液 (7ES-3G10單株)之力價,試驗以indirect ELISA分析,使 用單元抗體細胞培養液做2倍(V/V)系列稀釋至2056倍, 葵藜罹病葉粗汁液抗原做10倍系列稀釋至10⁶。結果顯示 以indirect ELISA分析時單元抗體細胞培養液稀釋至256 倍,康乃馨分離株罹病葵藜葉片粗汁液抗原稀釋至10⁻⁵, 仍產生明確可辨識之專一性反應;但當抗體稀釋至1024 倍時則無專一性反應產生。當相同之抗體及抗原以三層酵 素連結免疫分析,老鼠單元抗體細胞培養液稀釋至64 倍,粗汁液抗原稀釋至10⁻³,仍可產生明確專一性反應; 但當抗體稀釋至256倍時則無專一性反應產生。

為比較不同來源的 LNV 兔子抗體偵測 LNV 不同分離 株之效力,試驗以 indirect ELISA 分析,使用之抗體包括 洋桔梗壞疽病毒日本分離株(LNV-J) 兔子抗體⁽¹¹⁾,洋桔梗 壞疽病毒台灣分離株(LNV-L) 鞘蛋白兔子抗體⁽²⁾及本試驗 製備之 LNV-C 鞘蛋白兔子抗體等三種,供試抗體均稀釋 1000 倍;使用之抗原材料包括LNV-C 及 LNV-L 純化病毒 懸浮液(濃度為A260=0.5) 及葵藜罹病葉片粗汁液抗原。 結果 LNV-C 純化病毒懸浮液稀釋至 10⁻⁷,粗汁液稀釋至 10⁻⁷; LNV-L 純化懸浮液稀釋至 10⁻⁶,粗汁液稀釋至 10⁻⁶



圖二、康乃馨病毒陰染之電子顯微鏡圖。(A)以2% 醋酸鈾陰染感染康乃馨分離株之葵藜葉片粗汁液之病毒顆粒。(B)圖 A病毒顆粒之放大圖。(C)純化自葵藜之病毒顆粒。橫線=200 nm.

Fig. 2. Electron micrographs of negatively stained virions of carnation isolate of *Lisianthus necrosis virus* by 2% uranyl acetate. (A) Leaf dip preparation of infected *Chenopodium quinoa*; (B) Magnified particles of leaf dip sample; (C) Purified virions from infected *C. quinoa*. The bars represent 200 nm.

均可與LNV-C 抗血清產生專一性反應(圖六 A)。LNV-C 純化懸浮液稀釋至 10⁻⁶,粗汁液稀釋至 10⁻⁷;LNV-L 純化 懸浮液稀釋至 10⁻⁶,粗汁液稀釋至 10⁻⁷均可與LNV-L 兔子 抗體產生專一性反應(圖六 B)。LNV-C 純化病毒懸浮液稀 釋至 10⁻⁶,粗汁液稀釋至 10⁻⁶;LNV-L 純化懸浮液稀釋至 10⁻⁴,粗汁液稀釋至 10⁻⁶均可與LNV-J 兔子抗體產生專一 性反應(圖六C)。

討 論

洋桔梗壞疽病毒(LNV)在病毒分類學屬於Tombusviridae 科*Necrovirus* 屬,其病毒顆粒為球形二十面體,直徑約32 nm⁽¹⁵⁾。本試驗自康乃馨所分離之LNV-C,就其形態、生 物及血清等性質均與已報告之LNV 相似^(2,9),但若將兩種 病毒分離株機械接種12 種植物後之感染性加以比較,



圖三、感染康乃馨分離株之罹病植物超薄切片電子顯微鏡圖。(A) 罹病葵藜葉片之葉肉細胞原質體可觀察到病毒顆粒聚 集於基質內。(B) 罹病葵藜葉片葉肉細胞內被葉綠體包圍之細胞質內病毒顆粒呈結晶狀排列。(C) 罹病菸草(N. benthamiana) 葉片之葉肉細胞內,可發現大量病毒顆粒分佈於細胞質中。(D) 罹病菸草(N. benthamiana) 葉片之葉肉細胞 內病毒顆粒聚集成染色較深之不定型類似內含體構造。橫線=500 nm。

Fig. 3. Electron micrographs of ultrathin sections of carnation isolate of *Lisianthus necrosis virus* in infected cells. (A) Proplastid of *Chenopodium quinoa* showing the inclusion-like structure in the stroma containing virus particles; (B) Mesophyll cell of *C. quinoa* showing the virus-like particles aggregate as crystal structure in the cytoplasm embedding by the chloroplast; (C) Mesophyll cell of *Nicotiana benthamiana* showing the virus-like particles distributed throughout the cytoplasm; (D) Mesophyll cell of *N. benthamiana* showing the inclusion-like structure containing virus particles in the cytoplasm. The bars represent 500 nm \circ

LNV-C 可系統性感染五彩石竹及萬壽菊分別產生黃斑及壞 疽斑點病徵;但LNV-L 則不能感染。LNV-C 可系統性感 染紅 藜、 葵藜、 甜椒、 辣椒、 千日 紅 及 菸 草 (*N. benthamiana*)等供試植物且產生萎凋、黃化斑駁或壞疽斑 點等病徵;而 LNV-L 則僅能非系統性感染產生壞疽斑 點。整體而言,上述供試植物接種 LNV-C 時所表現之病 徵較接種LNV-L者嚴重,且病徵潛伏期較短。此外,康乃 馨分離株之耐保存時間也較長⁽²⁾。根據此生物特性分析, 所分離之LNV-C可能是一種致病性較強之LNV系統 (strain)。另外據我們所知本文乃發現自然界存在有能夠感 染康乃馨之LNV系統之首次紀錄。

本試驗證實康乃馨上新分離之病毒除可以五彩石竹 (D. chinensis.)及萬壽菊(T. erecta.)做為鑑別植物以區隔 LNV 之其他病毒系統(strains)如日本洋桔梗壞疽病毒分離 株及台灣洋桔梗壞疽病毒分離株外,利用陰染法或超薄切



圖四、SDS-polyacrylamide 電泳分析康乃馨分離株外鞘蛋白。康乃馨分離株(第一行),洋桔梗壞疽病毒(第二行),胡瓜嵌紋病毒(第三行),蛋白質分子量對照組(M)。 Fig. 4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of coat protein (CP) of carnation isolate of *Lisianthus necrosis virus* (LNV-C). Lane 1, CP of LNV-C; Lane 2, CP of LNV-L; Lane 3, CP of *Cucumber mosaic virus* and Lane M, molecular weight markers.

片法再行電子顯微鏡鏡檢亦極易觀察到病毒顆粒。在病毒 偵測方面,血清學方法如雙向免疫擴散反應(double diffusion)、酵素聯結免疫反應(indirect ELISA, tripleantibody sandwich ELISA)亦可快速偵測病毒感染。本試 驗所製備之單元抗體(7ES-3G10)使用於indirect ELISA分 析時,以罹病葵藜葉片粗汁液為抗原時,當抗體濃度固 定,抗原稀釋倍數增加時,抗體與抗原間之非專一性反應 有明顯增加的現象,這種現象在抗體濃度高時表現愈明 顯。但在三層酵素連結免疫分析(triple-antibody sandwich ELISA, TAS- ELISA)此種現象則不復發生。根據以上現 象本試驗所製備之老鼠單元抗體應用於三層酵素連結免疫 分析似較應用於 indirect ELISA 更能精確偵測LNV 病毒。



圖五、免疫擴散反應測定康乃馨分離株(LNV-C)與洋桔梗 壞疽病毒台灣分離株(LNV-L)之血清類緣關係。LNV-C 兔子抗體(中央穴);純化LNV-C(第1穴),LNV-C罹病洋 桔梗葉片粗汁液(第4穴);純化LNV-L(第2穴),LNV-L 罹病洋桔梗葉片粗汁液(第5穴);健康洋桔梗葉片粗汁液 對照(第3,6穴)。

Fig. 5. Serological relationship between carnation isolate of *Lisianthus necrosis virus* (LNV-C) and LNV-L in immunodiffusion test. Antibody prepared to LNV-C (center well); purified LNV-C (well 1), crude sap of LNV-C infected lisianthus leaves (well 4); purified LNV-L (well 2) and crude sap of LNV-L infected lisianthus leaves (well 5); crude sap of healthy lisianthus leaves (well 3 and 6).

LNV 最早於 1984 在日本琦玉縣之洋桔梗上被發現 (9,10)。在台灣,1995年3月彰化縣永靖鄉江姓花農設施栽 培之洋桔梗曾嚴重發生枝葉產生壞疽斑點之不明病害,經 進一步分離、鑑定,證實係由LNV所引起⁽²⁾。由於該地 區僅此一農戶種植之洋桔梗發生此種病害,1995年9月同 一設施再次栽培洋桔梗,約一個多月後植株再度出現被 LNV 感染之病徵,顯然病毒仍然存在該先前發病之土壤 中,園主於1996年5月廢園並改種植海芋,即未再發現 有 LNV 感染的蹤跡。根據以上資料以及其所使用之洋桔 梗種苗係由丹麥進口,因此筆者質疑該新病毒是隨種苗進 口而引入。1995年5月在彰化縣永靖鄉及田尾鄉迷你康乃 馨單瓣品系 "小可愛" 上發現許多植株上方葉出現淡黃色 斑點,經本試驗分離鑑定由LNV所引起,經隨後數年之 追蹤在前述地區並未發現有類似感染 LNV 的現象,由於 前述地區花農種植之小可愛品系種苗係由荷蘭進口, LNV 拌隨種苗進口而引入的可能性不能排除。在田間除 小可愛品系外,其他重瓣花系康乃馨則未發現有感染 LNV 的現象。



圖六、以間接酵素連結免疫分析法比較不同抗體偵測洋桔梗壞疽病毒(LNV)之效力。康乃馨分離株(LNV-C)抗血清 (A);洋桔梗壞疽病毒台灣分離株(LNV-L)抗血清(B);洋桔梗壞疽病毒日本分離株(LNV-J)抗血清(C)。感染LNV-C之 葵藜葉片粗汁液抗原(—▲—);純化LNV-C(A405=0.5)(—△—);感染LNV-L之葵藜葉片粗汁液抗原(—●—);純化 LNV-L病毒(A405=0.5)(—○—);對照健康葵藜葉片粗汁液(---●---)對照葵藜純化液(---▲---)。

Fig. 6. Serological comparisons of carnation isolate (LNV-L), lisianthus isolate (LNV-L), and Japanese isolate (LNV-J) of *Lisianthus necrosis virus* in indirect ELISA. Antibodies against LNV-C (A), LNV-L (B) and LNV-J (C) were used to react with antigens of LNV-C infected *Chenopodium quinoa* leaves (--), purified virions of LNV-C (--), LNV-L infected *C. quinoa* leaves (--), purified virions of LNV-C (--), LNV-L infected *C. quinoa* leaves (--), purified virions of LNV-C (---), and purified (---) antigens of *C. quinoa*. Antigens were coated on polystyrene EIA plates followed by treating with antibodies against three different LNV isolates and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG.

參考文獻

- Brunt, A. A. 1988. New economically important virus and virus-like diseases of ornamental plants. Acta Hortic. 234:505-514.
- Chen, C. C., Chen, Y. K., and Hsu, H. T. 2000. Characterization of a virus infecting Lisianthus. Plant Dis. 84:506-509.
- 3. Chen, C. C., and Hu, C. C. 1999. Purification and characterization of a cucumovirus from *Lisianthus*

russellianum. Plant Prot. Bull. 41:179-198.

- 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. Agr. Exp.Sta. Bull. No. 872. 45pp.
- Francki, R. I. B., Mossop, D. W. and Hatta, T. Cucumber mosaic virus. No.213. Descriptions of plant viruses. Commonw, Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Keww,

Surren, England.

- Halk, E. L., Hsu, H. T., Aebig, J. and Franke, J. 1984. Production of monoclonal antibodies against three ilarviruses and alfalfa mosaic virus and their use in serotyping. Phytopathology 74:367-372.
- 7. Hollings, M. and Stone, O. M. 1970. Carnation mottle virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses. No.7.
- Hsu, H. T., and Lawson, R. H. 1985. Comparison of mouse monoclonal antibodies and polyclonal antibodies of chicken egg yolk and rabbit for assay of carnation etched ring virus. Phytopathology 75:778-783.
- Iwaki, M., Hanada, K., Maria, E. R.A., and Onogi, S. 1987. Lisianthus necrosis virus, a new necrovirus from *Eustoma russellianum*. Phytopathology 77:867-870.
- Iwaki, M., Maria, E. R. A., Hanada, K., Onogi, S., and Zenbayashi, R. 1985. Three viruses occurred in Lisianthus plants. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 52:355.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- 12. Lisa, V. 1995. Carnation. In G. Loebenstein, R. Lawson,

and A. A. Brunt, eds. Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops. P. 385-395. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom. 543 pp.

- Lisa, V., Luisoni, L., and Milne, R. G. 1986. Carnation cryptic virus. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No.315.
- Lommel, S. A., Mccain, A. H., and Morris, T, J. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathology 72:1018-1022.
- Tremaine, J. H. and Dodds, J. A. 1985. Carnation ringspot virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No.308.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. 2000. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division, International Union of Microbiological Societies. Academic Press.

ABSTRACT

Chen, C. C. ^{1,4}, Chen, Y. K. ², Ko, W. F. ¹ and Hsu, H. T. ³ 2002. Characterization of *Lisianthus necrosis virus* (genus *Necrovirus*) isolated from *Dianthus caryophyllus*. Plant Pathol. Bull. 11:137-146. (^{1.} Taichung District Agricultural Improvement Station, Tatsuan, Changhua, 515, Taiwan; ^{2.} Department of Plant Pathology National Chung-Hsing University. Taichung 402, Taiwan; ^{3.} Floral and Nursery Plants Research Unit, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville, MD 20705-2350, USA; ^{4.} Corresponding author, E-mail: Chencc@tdais.gov.tw; Fax: 886-4-8521140

A virus was isolated from mini-carnation [*Dianthus* hybrid Kooij (Echo kgr)] bearing severe viral symptoms. Disease symptoms began on upper leaves with numerous yellow spots, which enlarged and fused into large chlorotic patches expanding to entire leaves. The symptomatic leaves usually became necrotic eventually. Electron microscopy of crude extracts and ultrathin sections of diseased tissues revealed the presence of isometric particles about 32-33 nm in diameter. Similar particles were also purified from diseased tissues of *Chenopodium quinoa*. Purified virus and extracts of diseased leaves of carnation isolate from *C. quinoa* reacted positively to *Lisianthus necrosis virus* (LNV) antiserum in immunodiffusion and indirect ELISA tests. Mouse monoclonal antibodies prepared to the purified virus of carnation isolate reacted positively in both indirect and triple-antibody sandwich ELISA with the extracts of infected leaves of carnation isolate from *C. quinoa*. The viral capsid protein was approximately 38 kDa based on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, similar to the size of the LNV coat protein. The virus isolated from carnation isolate experimentally induces systemic infection in many hosts which are either non-hosts or local lesion hosts for LNV.

Key word: Dianthus caryophyllus L., Lisianthus necrosis virus isolation, identification