

番茄叢矮病毒屬快速檢測方法之研發與應用

張雅君^{1,2} 李淑娟¹ 林怡初¹

¹ 台北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

² 連絡作者，電子郵件：ycchang@ntu.edu.tw；傳真：+886-2-23620271

接受日期：中華民國 93 年 11 月 17 日

摘要

張雅君、李淑娟、林怡初. 2005. 番茄叢矮病毒屬快速檢測方法之研發與應用. 植病會刊 14: 41-50.

Tombusvirus (番茄叢矮病毒) 泛指 *Tombusviridae* 科, *Tombusvirus* 屬的球形、單鏈正股之 RNA 病毒, 有多個成員具經濟重要性, 但國內並無正式報導。為避免 tombusvirus 伴隨進口的蔬果、種子和種苗引入國內, 本研究希望建立一套 tombusvirus 快速檢測方法, 以協助國內的植物檢疫工作。我們先收集各種 tombusvirus 序列, 選擇全長序列解序完成的病毒, 針對各基因之胺基酸序列進行多序列並列比對。根據所獲得之序列比對結果, 找出保守性較高之區域, 設計數個對應之 *Tombusvirus* 屬專一性引子。此外, 我們從國外研究學者取得番茄叢生矮化病毒 (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) 與胡瓜壞疽病毒 (*Cucumber necrosis virus*, CNV) 的 cDNA 株, 利用自行設計的 *Tombusvirus* 屬專一性引子, 以聚合銜鎖反應進行測試, 結果發現各種引子組合皆可增幅出預期大小的 TBSV 和 CNV 產物。之後同樣以各種 *Tombusvirus* 屬引子組合, 分別對混合 TBSV 或 CNV RNA 轉錄體的植物全 RNA 進行反轉錄聚合銜鎖反應 (reverse transcription - polymerase chain reaction, RT-PCR), 結果顯示以 T-F3/T-R3 引子對的檢測效果最佳。當植物全 RNA 是以 Viogene 套組純化時, T-F3/T-R3 引子對可檢測出至少 1 fg 病毒 RNA 轉錄體, 較 ammonium carbonate buffer 純化的 RNA 樣品靈敏 10 倍。為建立使用方便而且準確性高之 tombusvirus 快速檢測方法, 我們嘗試調整檢測步驟, 以 Viogene 套組純化植物全 RNA, RT-PCR 反應時除了 T-F3/T-R3 引子對外, 多加入 18S rRNA 專一性引子對, 以檢查是否有任何錯誤發生。因此當我們以此方法檢測樣品時, 不帶有 tombusvirus 的樣品都應該會增幅出一條 555 bp 來自 18S rRNA 之 DNA 片段, 而遭受 tombusvirus 感染的樣品除了有 555 bp 產物外, 還會增幅出屬於 tombusvirus 的 959 bp 產物。我們利用此快速檢測法針對美國加州、越南和泰國進口之高苜, 共 190 件樣品進行檢測, 結果未曾發現有 tombusvirus 感染的情形。因以前未曾有針對 *Tombusvirus* 屬而設計的檢測方法, 所以本研究所發表的快速檢測方法為世界首例, 未來可應用於多種植物的 tombusvirus 檢測。

關鍵詞：番茄叢矮病毒屬、屬專一性引子、反轉錄聚合銜鎖反應

緒言

根據台灣植物病害名彙統計, 目前國內有記載的植物病毒種類以 potyvirus, potexvirus, carlavirus, closterovirus, tobamovirus 等絲狀或桿狀病毒為主, 亦有數種具外套膜的 tospovirus, 而球形病毒中則以胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 研究較多, 其餘多為零星之報導⁽¹⁾。對於重要的球形病毒 tombusvirus (番茄叢矮病毒), 國內並無正式報導。Tombusvirus 泛指 *Tombusviridae* 科, *Tombusvirus* 屬的球形、單鏈正股之 RNA 病毒, 其蛋白質外鞘由 180 個鞘蛋白單體 (capsid protein subunit) 以二十面體對稱方式組合而成⁽²⁾。根據國際病毒分類委員會 (ICTV) 的第七期報告, *Tombusvirus* 屬目前共有十三種病毒, 而番茄叢生矮化病毒 (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) 為此屬之模式種 (type species), 最具經濟重要性和危險性⁽³²⁾。TBSV 於 1935 年首先在英國的罹病番茄植株上被發現⁽³⁰⁾, 此後在世界各地陸續都有報導, 包括地中海地區、歐洲、南美

洲與北美洲⁽²¹⁾。TBSV 寄主範圍廣泛, 包括番茄^(9, 19)、椒、菠菜⁽⁸⁾、茄子⁽⁶⁾、櫻桃^(3, 16)、蘋果⁽²⁾、葡萄^(5, 20)、牽牛、鬱金香^(20, 22)等, 涵蓋了多種重要的蔬菜、果樹及卉作物, 且曾經造成重大損失^(6, 9, 19)。同屬的蕙蘭輪點毒 (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) 於 1963 年在英國發現, 遭受感染的蕙蘭植株之葉片會產生黃色輪點; 之有報告指出白花苜蓿 (white clover, *Trifolium repens*) 亦遭 CymRSV 感染⁽¹⁴⁾。雖然 CymRSV 目前只在歐洲被發現若與蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV) 混感染, 則將使 CymMV 所引起的病徵加重⁽¹³⁾, 對國內 E 重要的蘭花產業有潛在的威脅, 不可輕忽。

Tombusvirus 除了可經由機械方式傳播外, 大部分員可經土壤傳播, 使得所種植的健康種苗被殘留在土中病毒危害^(15, 32)。遭受 TBSV 感染之無病徵番茄植株其帶毒率高達 50-65%⁽³¹⁾, 加上 TBSV 被證實可經由污染澆水而感染其他植株^(17, 31), 故有可能造成大面積的病害生。2001 年 Obermeier 等人證實近十年來美國加州和亞

桑那州所生產之高苣經常遭受 TBSV、胡瓜壞疽病毒 (*Cucumber necrosis virus*, CNV) 與新發現的高苣壞疽矮化病毒 (*Lettuce necrotic stunt virus*, LNSV) 等三種 tobusvirus 危害，成為高苣生產的限制因子，並且推測造成大面積流行的原因之一可能與河水氾濫而傳播病毒有關⁽²³⁾。

因我國每年從美國加州進口大量高苣，為避免 tobusvirus 伴隨進口的蔬果、種子或種苗引入國內，本研究希望建立一套 tobusvirus 快速檢測方法，以協助國內日趨繁重的植物檢疫工作。由於國內並無 tobusvirus 的罹病材料，因此想純化病毒製備抗體有其困難性。若想使用 ELISA 檢測 tobusvirus，則必須向國外廠商購買各種 tobusvirus 的抗體，所需費用極為可觀。由於利用廣效性的 degenerate primer 配合反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription - polymerase chain reaction, RT-PCR) 而鑑定 potyvirus，已有許多成功的例子^(4, 10, 18, 33)，相信同樣的方法可應用在其他病毒的鑑定與檢測。目前雖然沒有報告以相似的策略檢測 tobusvirus，但因為已有數種 tobusvirus 有完整的序列資料，因此我們選擇對這些病毒進行序列資料與其他資料之收集。目前得知 TBSV 基因體 RNA (genomic RNA) 全長 4.8 kb，核酸序列已經完全被解出，含有五個主要的轉譯架 (open reading frame, ORF)⁽¹²⁾ (圖一)。其 5' 端的第一個 ORF 會產生 33 kDa (p33) 蛋白質，然後以 readthrough 終止碼 UAG 的方式產生 92 kDa (p92) 蛋白質，此二者皆為 TBSV 病毒複製所需。其下游的 ORF3 為病毒之鞘蛋白基因，必須先由一個 2.2 kb 次基因體 RNA (subgenomic RNA) 轉譯，才能產生 41 kDa (p41) 鞘蛋白。在 TBSV 之 3' 端位置上有二個重疊基因 (nested genes)，是由另一個 0.9 kb 次基因體 RNA 負責轉譯，產物分別是 22 kDa (p22) 與 19 kDa (p19) 之蛋白質。p22 已證實與 TBSV 的細胞間移動有關，而 p19 會影響 TBSV 在某些植物的長距離移動⁽²⁹⁾。除此之外，p22 與 p19 亦是 TBSV 的病徵決定因子⁽²⁸⁾。CymRSV 基因體 RNA 全長核酸序列亦被解出，共有 4733 個核啟酸⁽¹¹⁾，也含有五個 ORF，基因體結構與 TBSV 極為相似。CNV 於 1959 年首次在加拿大溫室栽培的胡瓜中被發現，其核酸序列亦全部被解出⁽²⁵⁾，基因體結構與前兩種病毒相似。

為設計 *Tombusvirus* 屬的屬專一性引子 (genus-specific degenerate primer)，我們先收集該屬全長序列解序完成的病毒，進行胺基酸序列比對分析，找出幾個保守性較高的區域，針對該區域設計引子。同時從國外學術研究機構引

進 TBSV 與 CNV 的 cDNA 株 (pTBSV 與 pCNV)，用以測試我們所研發引子對之專一性。首先以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 對各種引子組合進行初步的篩選，然後再以 TBSV 與 CNV 的 RNA 轉錄體 (transcript) 為材料，使用 RT-PCR 對所篩選的引子組合進行進一步的測試，篩選出一組專一性最佳的引子對，配合其他條件的測試，建立一套 tobusvirus 的快速檢測方法提供植物檢疫使用。

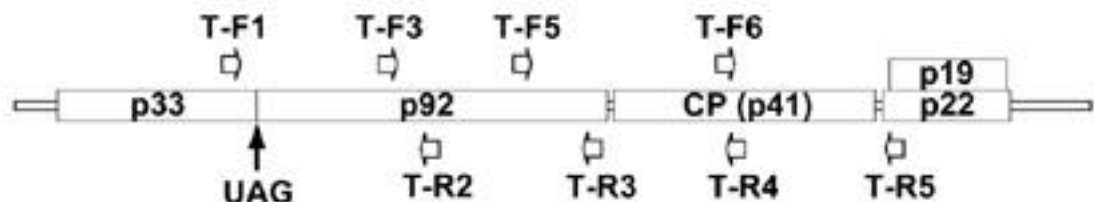
材料與方法

Tombusvirus 序列之收集分析與屬專一性引子之設計

由 GenBank 和 NCBI 網站搜尋各種 tobusvirus 的核酸與胺基酸序列，接著對所收集的資料進行分析整理。採用 GCG 程式 (Wisconsin Package version 10.3, Accelrys Inc., CA, USA) 所提供之 PileUp 功能，進行胺基酸序列之多序列並列比對，以了解不同種類的 tobusvirus 其各個基因胺基酸序列的異同。根據所獲得之序列比對結果，找出保守性較高之區域，利用 CODEHOP 程式⁽²⁶⁾ 設計出數個對應之屬專一性引子，供後續 PCR 和 RT-PCR 實驗使用。

國外重要 tobusvirus cDNA 株之收集與質體 DNA 之少量製備

承蒙 Dr. T. Jack Morris (School of Biological Sciences, University of Nebraska, Lincoln, USA) 提供 TBSV 與 CNV 之 cDNA 株 (pTBSV 與 pCNV)^(12, 24)。將適量的質體 DNA 轉型至大腸桿菌 (DH5⁺)，隔日挑取單一菌落，接種至含 100 ppm ampicillin 之 2 ml LB 培養液中，於 37[°] 震盪培養 12-16 小時，取 1.5 ml 菌液至 1.5 ml 微量離心管中，以 12,000 rpm (Microfuge[™] Lite Centrifuge, BECKMAN, CA, USA) 離心 30 秒，倒去上層液，以 alkaline lysis 的方法抽取質體 DNA⁽²⁷⁾。首先加入 100 μ l Solution I 均勻懸浮，再加入新鮮配製的 200 μ l Solution II，輕輕搖動，靜置於冰中 5 分鐘，最後加入 150 μ l Solution III，輕輕搖動，靜置於冰中 5 分鐘。以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，將上清液倒至另一新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 450 μ l PCI (phenol: chloroform: isoamylalcohol = 25:24:1)，以震盪器充分震盪 (vortex) 10 秒，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上層液，



圖一、番茄叢生矮化病毒基因體圖譜與 *Tombusvirus* 屬專一性引子之相對坐落位置。

Fig. 1. Schematic diagram of the genome organization of *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) and the relative locations of *Tombusvirus* genus-specific degenerate primers. The position of UAG amber codon within the replicase genes (p33 and p92) is indicated by a vertical arrow. The corresponding positions and directions of the primers are indicated by horizontal arrows. T-F1, T-F3, T-F5 and T-F6 are forward primers; T-R2, T-R3, T-R4 and T-R5 are reverse primers.

移入另一新的 1.5 ml 微量離心管中，再加入 1000 μ l 的 100% 酒精，以震盪器充分震盪，靜置於室溫 3 分鐘。然後以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，沉澱物以 70% 酒精清洗三次，真空乾燥後，溶於 50 μ l TE 緩衝液 (pH 8.0)。

聚合酶鏈鎖反應

於 0.2 ml 薄壁微量離心管中加入 PCR 反應所需各項成份，包括 5 μ l 質體 DNA 溶液 (2 ng/ μ l)、5 μ l 10X PCR buffer、5 μ l dNTPs (2 mM)、5 μ l 正向引子 (5 μ M)、5 μ l 反向引子 (5 μ M)、24.5 μ l H₂O 及 0.5 μ l DyNAzyme II DNA polymerase (2 U/ μ l, Finnzymes Inc., Finland)，總反應體積為 50 μ l。以 GeneAmp[™] PCR system 2400 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, CA, USA) 進行 PCR 反應如下：先 94 3 分鐘；再以 94 30 秒 (deaturation)，55 30 秒 (annealing)，72 1 分鐘 (extension)，進行 35 個循環 (cycles)；最後再以 72 反應 7 分鐘，即完成反應。取 3.5 μ l 的 PCR 產物進行 1% 凝膠電泳分析。

質體 DNA 之大量製備 (maxipreparation)

將 pTBSV 與 pCNV 分別轉型至大腸桿菌 (DH5⁺)，大量增殖菌體；然後利用 alkaline lysis 配合氯化銣 (CsCl) 密度梯度離心法⁽²⁷⁾，大量純化 pTBSV 與 pCNV 質體 DNA。

RNA 轉錄體之製備

以 *Sma*I 內限制酶先將質體 DNA (pTBSV 與 pCNV) 切開成直線，作為 DNA 模板，再以 T7 RNA polymerase 於 37 進行生體外轉錄反應 (*in vitro* transcription)⁽²⁷⁾。反應結束後以 RNase-free DNase I 去除 DNA 模板，經 phenol 與 chloroform 萃取，再加入 0.1 倍體積之 3 M sodium acetate (pH 5.2) 與 3 倍體積的 100% 酒精 (儲存於 -20)，混合均勻後於 -20 沉澱。隔日以 14,000 rpm 在 4 離心 15 分鐘，將沉澱物 (即 TBSV 或 CNV 之 RNA 轉錄體) 乾燥後分別溶於 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 處理過之水中 (DEPC-H₂O)，以模擬 TBSV 與 CNV 之病毒 RNA，供後續實驗使用。

植物全 RNA 之純化

研鉢及鉢棒先經 180 處理 4 小時，冷卻後備用。將 0.35 g 植物組織加入 700 μ l ammonium carbonate buffer⁽⁷⁾、700 μ l phenol 及 21 μ l 2-mercaptoethanol，研磨後加入 700 μ l CI (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1)，倒入 1.5 ml 微量離心管中，以 12,000 rpm 在 4 離心 10 分鐘，將上層液再以 PCI 萃取二次及 CI 萃取一次。取出上層液，加入 0.1 倍體積的 3 M sodium acetate (pH 5.2) 與 3 倍體積的 100% 酒精 (儲存於 -20)，混合均勻後置於 -20 冰箱中。隔日自 -20 取出後，以 14,000 rpm 在 4 離心 15 分鐘，真空乾燥後，將沉澱物溶於 200 μ l DEPC-H₂O 中。

此外，我們亦以 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, CA, USA) 從植物組織抽取其全 RNA，步驟參照純化套組所附之使用說明。先稱取 0.1 g 葉片，加入液態氮後以研鉢及鉢棒磨成粉末狀，將研磨好的組織粉末移入 1.5 ml 微量離心管中，取 450 μ l RX buffer 加入上

述離心管中，劇烈震盪混合均勻。組合 shearing tube collection tube 上，將上述混合液加入 shearing tube 中，上管蓋後，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘。將 collection tube 的濾出液移到新的 1.5 ml 微量離心管中，避免取到最下的沉澱物。取 230 μ l 100% 酒精加入濾出液中，以微量量器上下吸放混合均勻。組合 plant total RNA mini column 於 collection tube 上，將上述混合液加入 plant total RNA mini column 中，蓋上管蓋後，以 10,000 rpm 1 分鐘，將出液丟棄。取 0.5 ml WF buffer 加入 plant total RNA mini column，以 13,000 rpm 離心 30-60 秒，將濾出液丟棄。取 0.7 ml WS buffer 加入 plant total RNA mini column，13,000 rpm 離心 30-60 秒，將濾出液丟棄。重複以 WF buffer 清洗的步驟。將 plant total RNA mini column 再 13,000 rpm 離心 3 分鐘，以完全去除殘留的 WS buffer。plant total RNA mini column 組合至新的 1.5 ml 微量離心管上，在 column 中加入 50 μ l DEPC-H₂O，以 13,000 rpm 離心 1-2 分鐘，將 RNA 流洗 (elute) 出來。所獲得的 RNA 液，以分光光度計分析 RNA 品質並測量其濃度，然後存於 -70 中備用。

反轉錄聚合酶鏈鎖反應

在 1.5 ml 微量離心管中依序加入 1 μ g 純化之植物 RNA、TBSV 或 CNV RNA 轉錄體、2 μ l 反向引子 (5 μ M) 並以 DEPC-H₂O 補足體積至 10 μ l，離心管置於 65 加 10 分鐘後，放入冰中 5 分鐘冷卻。之後分別加入反轉錄應混合試劑 15 μ l：包含有 5 μ l AMV RT 5X reaction buffer (Promega, WI, USA)、2 μ l dNTPs (2 mM)、0.5 μ l rRNA (40 U/ μ l, Promega, WI, USA)、7.5 μ l DEPC H₂O 及 1 AMV reverse transcriptase (10 U/ μ l, Promega, WI, USA) 總反應體積為 25 μ l。混合均勻後略為離心，將離心管於 42 反應 60 分鐘，以合成第一股 cDNA。然後取出 1 μ l 反轉錄產物進行 PCR 反應，於 0.2 ml 薄壁微量離心管加入 PCR 反應所需各項成份，包括 2 μ l 10X PCR buffer、2 μ l dNTPs (2 mM)、1 μ l 正向引子 (5 μ M)、1 反向引子 (5 μ M)、11.6 μ l H₂O 及 0.4 μ l DyNAzyme DNA polymerase (2 U/ μ l, Finnzymes Inc., Finland)，總反應體積為 20 μ l。以 GeneAmp[™] PCR system 2400 進行 PCR 反應如下：先 96 4 分鐘；再以 96 30 秒，52 30 秒，72 1 分鐘，進行 30 個循環；最後再以 72 反應 7 分鐘，即完成反應。取 10 μ l 的 RT-PCR 產物進行 1% 凝膠電泳分析。

Tombusvirus 快速檢測方法

利用 Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA) 系統，進行待測植物 RNA 之 RT-PCR 反應。將 Ready-To-Go tube (內含粒狀由包裝中取出，小心加入 47 μ l DEPC H₂O 後，放置於中 5 分鐘，待粒狀物完全溶解。將 Ready-To-Go tube 柱中取出，用手輕輕將液體拍勻，分別加入 1 μ l *Tombusvi* 屬專一性引子對 (T-F3/T-R3, 2.5 μ M)、1 μ l 18S rRNA 一性引子對 (18S rRNA-F/18S rRNA-R, 0.5 μ M) (表一) 以及所抽取的植物全 RNA 溶液 (1 μ g/ μ l) 1 μ l，混合均後略為離心。以 GeneAmp[™] PCR system 2400 進行 RT-PCR 反應。其反應條件如下：先進行 42 30 分鐘的 RT 反應

再進行 PCR 反應如下：先 96 °C 4 分鐘；再以 96 °C 30 秒，52 °C 30 秒，72 °C 1 分鐘進行 30 個循環；最後以 72 °C 反應 7 分鐘。取 10 μl 之 RT-PCR 產物進行 1% 凝膠電泳分析。

結果

Tombusvirus 序列分析之結果與屬專一性引子之設計

由 GenBank 和 NCBI 網站搜集國外所有 tombusvirus 的序列資料，目前共獲得 99 筆相關之序列，經整理後發現大部份序列資料屬於缺失干擾性 RNA (defective interfering RNA)。我們選擇全長序列解序完成的 tombusvirus，包括朝鮮薊斑駁皺葉病毒 (*Artichoke mottled crinkle virus*, AMCV; X62493)、康乃馨義大利環斑病毒 (*Carnation Italian ringspot virus*, CIRV; X85215)、CNV (M25270)、CymRSV (X15511)，和 TBSV 的三個分離株：TBSV-Ch (M21958)、TBSV-P (U80935) 和 TBSV-S (AJ249740)。將這些病毒各基因之胺基酸序列加以整理，再分別利用 GCG 程式所提供之 PileUp 功能，進行多序列並列比對，以了解其胺基酸序列的異同。由序列比對結果發現 tombusvirus 複製殼基因 (即 ORF1 和 ORF2) 的胺基酸序列保守性相當高；ORF4 基因的胺基酸序列保守性也相當高；而鞘蛋白基因差異較大，只有第 180 至 190 個胺基酸序列附近之區域相似度較高。因此針對這些區域，利用 CODEHOP 程式⁽²⁶⁾ 設計出數個對應之屬專一性引子。各個屬專一性引子所坐落的位置，以及其對應之胺基酸序列如下：位於複製殼基因的 T-F1: VMIEIMDKD，T-F3: MESKLMKAV，T-F5: QGGWKMV，T-R2: HNKKGKYVP，和 T-R3: WEMDLFGE；位於鞘蛋白基因中間區域的 T-F6: RVALYFDK 與 T-R4: YFDKDSQD；以及位於 ORF4 基因 5' 端的 T-R5: MDTEYEQVNKP (圖一)。而每個 *Tombusvirus* 屬專一性引子的寡核酸序列則條列於表一。

表一、本研究所使用之引子序列

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used in this study

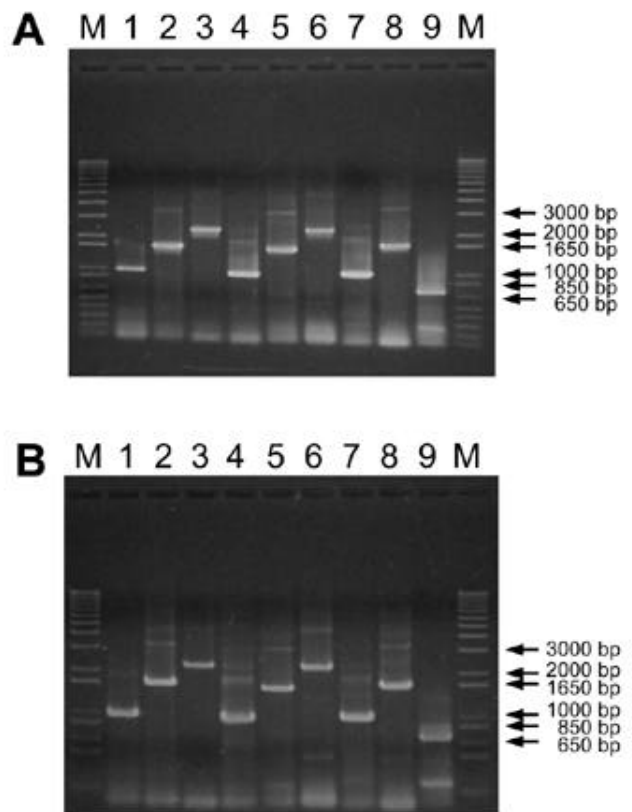
Primer ¹	Sequence ²
T-F1	5'CGTGATGATCGAGATCATGGAYAARGA3'
T-F3	5'CATGGAGTCCAAGCTGATGAARGCNGT3'
T-F5	5'CCAGGGCGGCTGGAARATGGT3'
T-F6	5'CCGCGTGGCCCTGTAYTTYGAYAA3'
T-R2	5'GGCACGTAGCCCTTGCCYTTRTTRTG3'
T-R3	5'TCGCCGAACAGGTCCATYTCCCA3'
T-R4	5'ATCCTGGGAATCCTTRTCRAARTA3'
T-R5	5'GCTTGTTACCTGCTCGTACTCNGTRTCCAT3'
TC-F	5'GAAATTCTCCAGGATTCTCGACCT3'
TC-R	5'GGGCTGCATTTCTGCAATGTTCCG3'
18S rRNA-F	5'CTGACACGGGGAGGTAGTGA3'
18S rRNA-R	5'CTGATCGTCTTCGAGCCCCCA3'

¹ F1, F3, F5, F6 and F indicate forward primers, whereas R2, R3, R4, R5 and R indicate reverse primers.

² Nucleotide at degenerate positions are represented by a single letter code; R = A and G; Y = C and T; N = A, C, G and T.

以 PCR 測試各種 *Tombusvirus* 屬專一性引子組合的增幅效果

為了解我們所設計的 *Tombusvirus* 屬專一性引子 (表一) 的實際增幅效果，因此以 PCR 對從 Dr. Morris 取得的 TBSV 與 CNV cDNA 株 (pTBSV 與 pCNV) 進行全面性的測試。結果發現所有測試的引子對，皆能從 pTBSV 與 pCNV，增幅出預期大小的 DNA 片段，但有時會有非專一性的 PCR 產物出現 (圖二)。當以 pTBSV 為 DNA 模版時，T-F1 配合 T-R2、T-R3 或 T-R4 進行 PCR 反應，可增幅出 995 bp、1670 bp 與 2309 bp 的 DNA 片段；若以 T-F3 配合 T-R3、T-R4 或 T-R5 進行 PCR 反應，則可增幅出 959 bp、1598 bp 與 2275 bp 的 DNA 片段；以 T-F5 分別和 T-R4 和 T-R5 進行 PCR 反應，可增幅出 1013 bp 與 1690 bp 的 DNA 片段；當以 T-F6 和 T-R5 進行 PCR 反應，可增幅出 714 bp 的 DNA 片段 (圖二A)。相似地，當以 pCNV 為 DNA 模版時，T-F1 配合 T-R2、T-R3 或 T-R4 進行 PCR 反應，可增幅

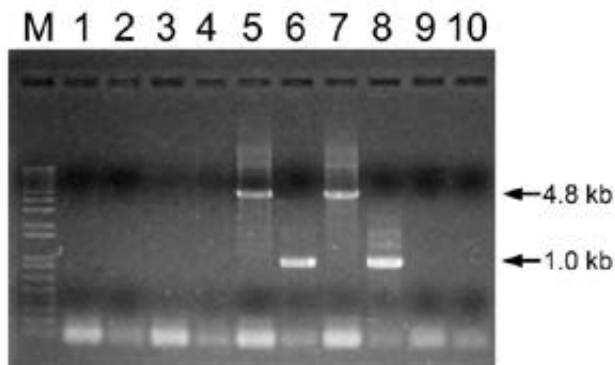


圖二、以不同組合的 *Tombusvirus* 屬專一性引子對增幅 TBSV 和 CNV cDNA 株之聚合鏈鎖反應結果之電泳圖譜。Fig. 2. Agarose gel electrophoreses of the PCR products amplified from the cDNA clones of TBSV and CNV using different combinations of *Tombusvirus* genus-specific degenerate primer pair. (A) The result was derived from the template of pTBSV. (B) The result was derived from the template of pCNV. Primer pairs used in PCR are as following: lane 1, T-F1/T-R2; lane 2, T-F1/T-R3; lane 3, T-F1/T-R4; lane 4, T-F3/T-R3; lane 5, T-F3/T-R4; lane 6, T-F3/T-R5; lane 7, T-F5/T-R4; lane 8, T-F5/T-R5; and lane 9, T-F6/T-R5. Lanes M, 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, CA, USA). Sizes of some mark bands are shown.

出 995 bp、1670 bp 與 2275 bp 的 DNA 片段；若以 T-F3 配合 T-R3、T-R4 或 T-R5 進行 PCR 反應，則可增幅出 959 bp、1564 bp 與 2233 bp 的 DNA 片段；以 T-F5 分別和 T-R4 和 T-R5 進行 PCR 反應，可增幅出 979 bp 與 1648 bp 的 DNA 片段；當以 T-F6 和 T-R5 進行 PCR 反應，可增幅出 706 bp 的 DNA 片段 (圖二B)。

以 RT-PCR 測試各種 *Tombusvirus* 屬專一性引子組合的增幅效果

為了解這些 *Tombusvirus* 屬專一性引子應用在 RT-PCR 檢測時，其結果是否與 PCR 反應相似，我們以 TBSV 與 CNV 的 RNA 轉錄體模擬病毒 RNA，以 RT-PCR 對各種引子組合進行全面性的測試。因此先大量製備 pTBSV 與 pCNV 質體 DNA 後，利用 *Sma*I 內限制酶將質體 DNA 直線化作為 DNA 模板，再以 T7 RNA polymerase 進行生體外轉錄反應，反應結束後以 DNase I 去除 DNA 模板，所獲得之 TBSV 與 CNV RNA 轉錄體分別溶於 DEPC-H₂O，並調整其濃度。為測試是否仍有 DNA 模板殘留在已處理過的 RNA 轉錄體中而影響後續的實驗，我們以兩組引子對，TC-F/TC-R 與 T-F1/T-R2 (表一)，分別進行 PCR 檢測。其中 TC-F 和 TC-R 為根據 TBSV 與 CNV 核酸序列所設計的專一性引子，應可增幅出約 4.8 kb 的病毒全長度基因體；而 T-F1 和 T-R2 為前述的屬專一性引子，則可增幅出約 1.0 kb 的基因體片段 (圖二，lane 1)。當以 pTBSV 和 pCNV 為模板時，確實可產生預期大小的 PCR 產物；但當以 TBSV 與 CNV RNA 轉錄體為模板時，卻不會增幅出任何 PCR 產物 (圖三)。由此可知，我們所製備的 RNA 轉錄



圖三、以 PCR 檢測經 DNase I 處理過之 TBSV 與 CNV RNA 轉錄體有無殘留之 DNA 模板。

Fig. 3. The residues of DNA templates in DNase I-treated TBSV and CNV RNA transcripts were checked by PCR reaction. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of TBSV and CNV RNA transcripts and cDNA clones using TC-F/TC-R primers (lanes 1, 3, 5, 7 and 9) and T-F1/T-R2 primers (lanes 2, 4, 6, 8 and 10). The templates used in PCR are as following: lanes 1 and 2, TBSV RNA transcripts; lanes 3 and 4 CNV RNA transcripts; lanes 5 and 6, pTBSV; lanes 7 and 8, pCNV; and lanes 9 and 10, H₂O. Lanes M, 1 kb Plus DNA Ladder. The expected PCR products of 4.8 kb (amplified by TC-F/TC-R primers) and 1.0 kb (amplified by T-F1/T-R2 primers) are indicated by the arrows.

體皆無 DNA 模板殘留，不會影響 RT-PCR 的測試。

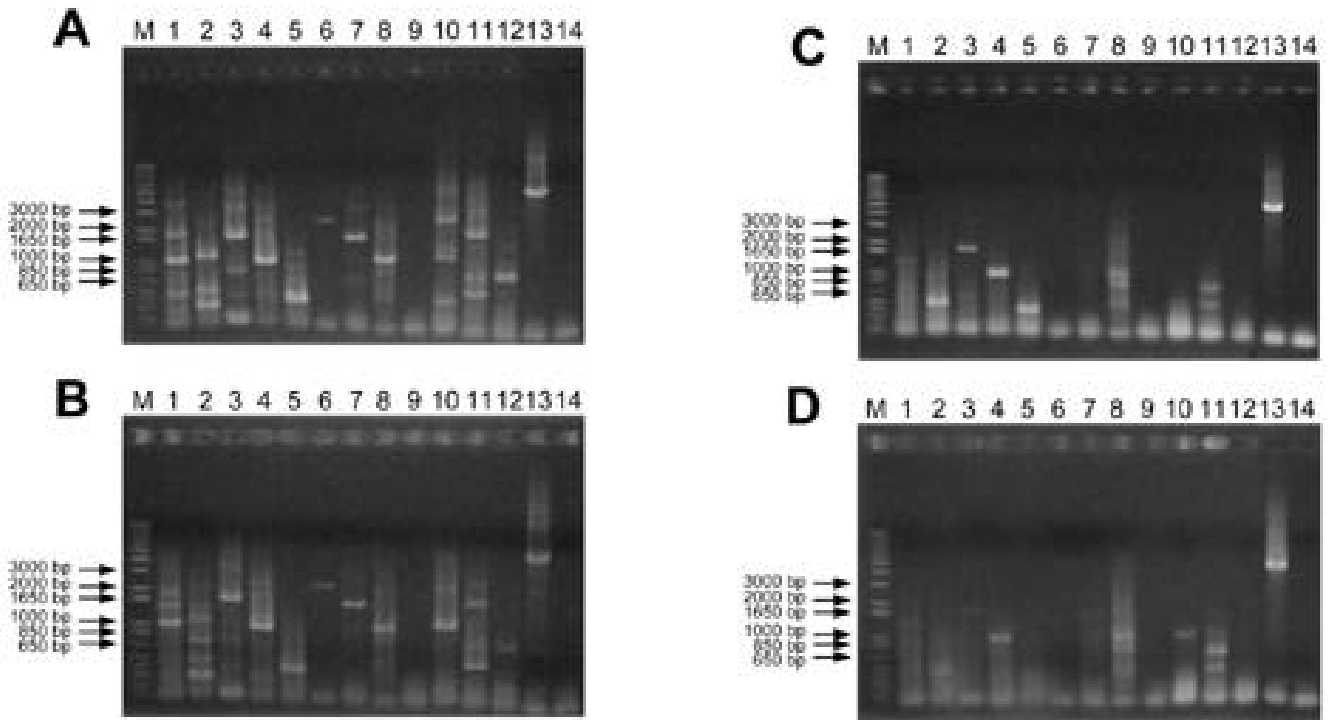
為模擬從植物樣品中檢測 tombusvirus 之情形，於 85 ng、8.5 ng、850 pg 和 85 pg 之 RNA 轉錄體中，分加入以 ammonium carbonate buffer 純化之 1 μg 菸草 RNA；再以 *Tombusvirus* 屬專一性引子對，分別對 TB 與 CNV RNA 轉錄體進行全面性的 RT-PCR 測試。結果現當 RNA 轉錄體高達 85 ng 時，T-F1/T-R3、T-F3/T-R3、T-F1/T-R4、T-F3/T-R4、T-F5/T-R4 和 T-F6/T-R5 引子對皆可增幅出預期大小的 TBSV (圖四A) 與 CNV (圖四B) RT-PCR 產物；當 RNA 轉錄體減少為 8.5 ng 時，T-F1/R3、T-F3/T-R3、T-F3/T-R4 和 T-F5/T-R4 引子對，可 TBSV 與 CNV 增幅出預期大小的 RT-PCR 產物 (data not shown)；當 RNA 轉錄體再減少為 850 pg 時，則只有 F1/T-R3 和 T-F3/T-R3 能專一性增幅出預期大小的 TBSV CNV 的 RT-PCR 產物 (data not shown)；當只加入 85 pg RNA 轉錄體時，雖然 T-F1/T-R3 和 T-F3/T-R3 仍可正確增幅出 TBSV 的 RT-PCR 產物 (圖四C)，但只有 T-F3/T-R3 可專一性地增幅出 CNV 959 bp 的 RT-PCR 產物 (圖四D) 此外，當我們以茄子全 RNA 取代菸草全 RNA 進行相同測試時，亦獲得相似的結果 (data not shown)。所以由實驗結果得知，所使用的植物全 RNA 不論是來自菸草或茄子，對 RT-PCR 的結果無明顯的影響；不過 TBSV 與 CNV RNA 轉錄體的量即模擬植物組織中病毒 RNA 的量，會影響 RT-PCR 的結果，其中以 T-F3/T-R3 引子對的測試結果最穩定且效果最佳，因此被選擇為後續實驗所使用的引子對。

反轉錄酶的種類與 PCR 黏合溫度對 RT-PCR 反應影響

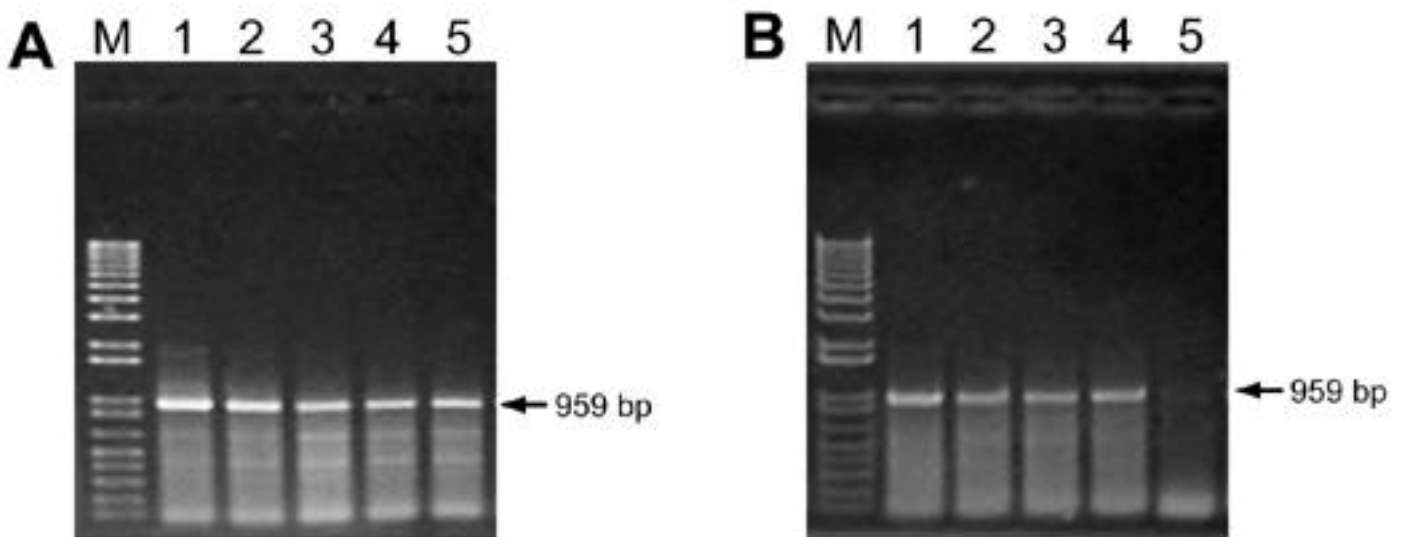
為了解當改變 RT-PCR 反應條件時，對檢測結果會何影響，我們以 TBSV 的 RNA 轉錄體混合菸草全 RNA 模版，先以 T-R3 為引子分別與 AMV 及 MMLV 反轉 (reverse transcriptase) 進行 RT 反應，再以 T-F3/T-R3 引子對進行 PCR 反應。而 PCR 反應則測試八種不同的黏合度 (annealing temperature)，從 50 至 57 °C，每隔 1 °C 進一次 PCR 反應。實驗結果顯示不論是改變反轉錄酶的種類或是改變 PCR 的黏合溫度，對檢測結果皆無顯著影響 (data not shown)。

Tombusvirus 快速檢測方法之建立與應用

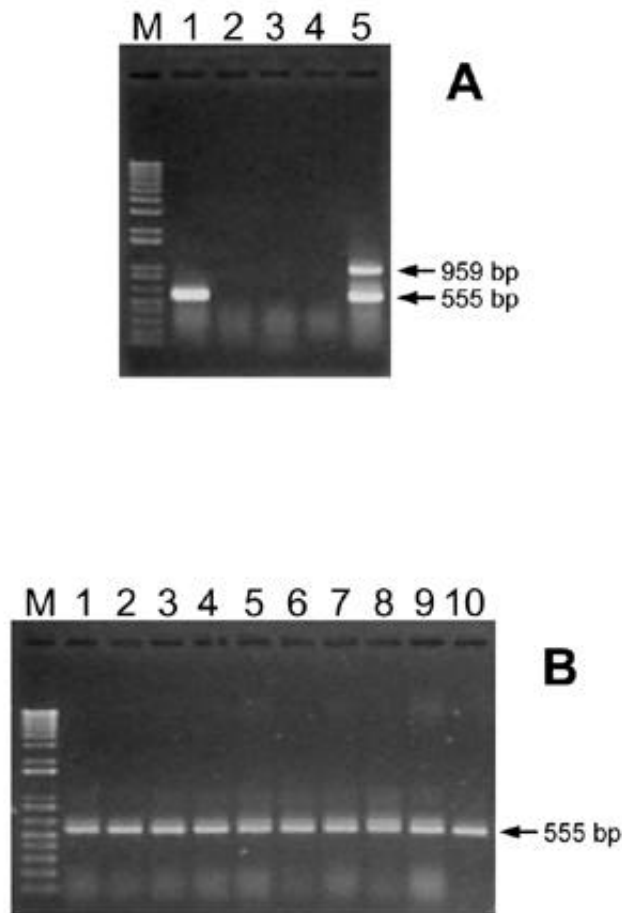
因為我們研發 tombusvirus 快速檢測方法的目的是希望能應用在植物檢疫上，尤其是進口萵苣的檢測；為避免因實驗操作時個人因素的影響而造成檢測結果的差異，此希望能以市售的植物 RNA 純化套組來取代目前的植物 RNA 純化方法。我們以 Viogene Plant Total RNA Extraction Miniprep System 和 ammonium carbonate buffer 純化方法，同時從萵苣葉片純化全 RNA，再分別加入倍系列稀釋的 TBSV RNA 轉錄體中，以 T-F3 與 T-R3 引子對進行 RT-PCR 檢測。結果發現若加入以 Viogene Plant Total RNA Extraction Miniprep System 純化之全 RNA，檢測出至少 1 fg (10⁻¹⁵ g) 的 TBSV RNA 轉錄體 (圖五A) 而當所加入的植物 RNA 是以 ammonium carbonate buffer 純化時，則只能檢測出 10 fg (10⁻¹⁴ g) 的 TBSV RNA 轉



圖四、以不同組合的 *Tombusvirus* 屬專一性引子對增幅 TBSV 和 CNV RNA 轉錄體之反轉錄聚合鏈鎖反應結果之電泳圖譜。
 Fig. 4. Agarose gel electrophoreses of the RT-PCR products of the RNA transcripts of TBSV and CNV using different combinations of *Tombusvirus* genus-specific degenerate primer pair. One μ g of tobacco total RNA was used and separately mixed with (A) 85 ng of TBSV RNA transcripts; (B) 85 ng of CNV RNA transcripts; (C) 85 pg of TBSV RNA transcripts; and (D) 85 pg of CNV RNA transcripts. Primer pairs used in RT-PCR are as following: lane 1, T-F1/T-R2; lane 2, T-F3/T-R2; lane 3, T-F1/T-R3; lane 4, T-F3/T-R3; lane 5, T-F5/T-R3; lane 6, T-F1/T-R4; lane 7, T-F3/T-R4; lane 8, T-F5/T-R4; lane 9, T-F1/T-R5; lane 10, T-F3/T-R5; lane 11, T-F5/T-R5; and lane 12, T-F6/T-R5. Lanes 13 and 14 are positive and negative controls. Lane M, 1 kb Plus DNA Ladder. Sizes of some mark bands are shown.



圖五、不同方法純化之萵苣全 RNA 對 TBSV RNA 轉錄體的反轉錄聚合鏈鎖反應的檢測靈敏度之影響。
 Fig. 5. The influence of lettuce total RNA purified by different methods on the RT-PCR detection sensitivity of TBSV RNA transcripts. Lettuce total RNAs were purified by (A) Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, CA, USA) and (B) ammonium carbonate buffer method, respectively. The templates used were 1 μ g of lettuce total RNA mixed with different amounts of TBSV RNA transcripts: lane 1, 10^{-11} g; lane 2, 10^{-12} g; lane 3, 10^{-13} g; lane 4, 10^{-14} g; and lane 5, 10^{-15} g. Lane M, 1 kb Plus DNA Ladder. The expected RT-PCR product of 959 bp indicated by arrow was RT-PCR amplified by T-F3/T-R3 primers.



圖六、應用 18S rRNA 專一性引子對和 T-F3/T-R3 引子對建立 *Tombusvirus* 屬快速檢測方法，以及利用此方法偵測進口萵苣樣品之結果。

Fig. 6. Establishment of a tombusvirus rapid detection method with 18S rRNA specific primers and T-F3/T-R3 primers and the detection result of imported lettuce samples by this method. (A) Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products of 18 S rRNA and TBSV using different combinations of templates and primers. Lettuce total RNA only (lanes 1 to 4) and mixture of TBSV RNA transcript and lettuce total RNA (lane 5) were used as templates. Primers used in RT-PCR are as following: lane 1, 18S rRNA-F/18S rRNA-R; lane 2, 18S rRNA-F; lane 3, 18S rRNA-R; lane 4, H₂O; and lane 5, 18S rRNA-F/18S rRNA-R and T-F3/T-R3. Lane M, 1 kb Plus DNA Ladder. The expected RT-PCR products of 555 bp (amplified by 18S rRNA-F/18S rRNA-R primers) and 959 bp (amplified by T-F3/T-R3 primers) are indicated by arrows. (B) Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products of imported American lettuce samples by our tombusvirus rapid detection method. Total RNAs were purified by Plant Total RNA Extraction Miniprep System and then RT-PCR amplified by 18S rRNA-F/18S rRNA-R and T-F3/T-R3 primer pairs. Only 555-bp RT-PCR products amplified from 18S rRNA were detected (lanes 1 to 10). Lane M, 1 kb Plus DNA Ladder.

體(圖五B)。因此利用 Viogene 植物 RNA 純化套組純化物全 RNA 時，除了可減少人為因素所造成的實驗誤外，同時使 RT-PCR 檢測較來自 ammonium carbon buffer 純化的樣品靈敏 10 倍。

若我們所欲檢測的進口樣品感染 tombusvirus 的機不高時，則會使得 RT-PCR 的結果常為負反應，即無產物。為了避免發生因為 RT-PCR 反應出錯無法增幅出物，而誤判實驗結果為負反應，我們決定應該加入反應在對照組 (internal control)，同時改用市售的 RT-PCR 試 (Ready-To-Go RT-PCR Beads)，以減少人為錯誤的機率經參考多種植物的 18S rRNA 的序列，我們設計一組 1 rRNA 專一性引子：18S rRNA-F 與 18S rRNA-R (表一以檢查 RT-PCR 反應是否正常。由結果可確知當 Viogene 植物 RNA 純化套組所純化的萵苣全 RNA 為材時，只有加入 18S rRNA-F/18S rRNA-R 才會增幅出一條度約為 555 bp 之 DNA 片段，若不加引子或只加入一種子是不會增幅出任何產物的 (圖六A)。若將 TBSV RNA 錄體與萵苣全 RNA 混合，同時加入 T-F3/T-R3 和 1 rRNA-F/18S rRNA-R 兩對引子進行 RT-PCR 時，可清楚看出來自 TBSV 的 959 bp 大小的 RT-PCR 產物，以及 555 bp 由 18S rRNA 增幅而來的 DNA 片段 (圖六A)。因此以兩對引子為受檢測樣品進行 RT-PCR 時，不帶 tombusvirus 的樣品都應該會增幅出一條 555 bp 之 DNA 段，而遭受 tombusvirus 感染的樣品則會產生 959 bp 和 555 bp 的 DNA 片段。

當我們以自行建立之 tombusvirus 快速檢測方法，美國加州、越南和泰國進口之 190 件萵苣樣品進行檢測包括新竹分局對美國加州進口之萵苣進行三次抽樣，共十件樣品；高雄分局對美國加州、越南和泰國進口之萵苣送件十二次，共一百三十件樣品。結果顯示除了三件樣品因腐壞無法檢測外，所有進口萵苣樣品皆未檢測 tombusvirus (圖六B)。

討 論

美國加州和亞利桑那州有 TBSV、CNV 和 LNSV 三種 tombusvirus 的危害，已成為該地區萵苣生產的限制因子⁽²⁾。由於台灣每年從加州進口大量萵苣，應特別小心防範這種病毒入侵。本研究最主要的動機是因為國內 tombusvirus 的正式報告，因此希望能研發出 tombusvirus 快速檢測方法，協助國內的植物檢疫工作。我們不採 ELISA 作為 tombusvirus 的檢測方法，主要的原因是國內沒有這些病毒材料，因此製備抗體有困難；此外，有 tombusvirus 的鞘蛋白基因差異很大，例如 TBSV、CNV 和 CymMV 的鞘蛋白胺基酸序列相同度只有 37-44.5%⁽¹²⁾，此必須每一種病毒分別製備自己的專一性抗體，所需的時間和人力較多；若向國外廠商購買各種 tombusvirus 的抗體，所需費用極為可觀。因為利用廣效性的 degenerate primer 配合 RT-PCR 而鑑定同屬植物病毒已有許多成功例子^(4, 10, 18, 33)，相信同樣的方法可應用在 tombusvirus 鑑定與檢測。因此我們根據 tombusvirus 胺基酸序列保守性高的區域，利用 CODEHOP 程式設計四個正向引子和一個反向引子，當以 TBSV 與 CNV 的 cDNA 株為模板測

這些引子對時，雖然有少許非專一性的 DNA 片段出現，但主要的 PCR 產物符合預期的大小，顯示各組引子對都有不錯的專一性（圖二）。但當以 TBSV 與 CNV 的 RNA 轉錄體模擬病毒 RNA，測試這些引子對之專一性時，各引子對 RT-PCR 檢測的效果差異極大，其中以 T-F3/T-R3 的引子組合效果最佳且測試結果最穩定，在含有以 ammonium carbonate buffer 純化之植物全 RNA 的溶液中，能檢測出 85 pg 之 RNA 轉錄體（圖四）。為何 PCR 與 RT-PCR 的測試結果有此差異，推論可能的原因為 RT-PCR 的實驗樣品加入了植物全 RNA，可能其中含有干擾或抑制反應的物質，使得 RT-PCR 的增幅效果大幅降低。此外，大部分 RT-PCR 實驗所加入的 RNA 轉錄體之量（8.5 ng、850 pg 和 85 pg）低於 PCR 實驗所加入的質體 DNA 之量（10 ng），而從我們的實驗結果已知 RNA 轉錄體的量會影響引子對的增幅結果，即每對引子所能檢測的最低量不同。因此 PCR 與 RT-PCR 的測試結果有差異，是可以理解的。至於為何有些反應會有非專一性的產物出現（圖二，圖四 AB），推論可能的原因為所加入的模板太多，加上所使用的引子皆為 degenerate primer，在所設定的反應條件下與其他非目標序列黏合，因此產生非專一性的 PCR 或 RT-PCR 產物。因為我們 RT-PCR 的實驗設計較接近實際的檢測狀況，所以由此方法所篩選出的 T-F3/T-R3 引子對應該是最佳選擇。為進一步確定 T-F3/T-R3 引子對的專一性，我們選擇了 cucumovirus、potexvirus、potyvirus 和 tobusvirus 接種的植物分別進行測試，結果只有 tobusvirus 感染的樣品增幅出 959 bp 的 RT-PCR 產物，其他病毒感染的樣品則無特定大小的 DNA 片段被增幅出來（data not shown）；由此看來，T-F3/T-R3 應該可稱為 *Tombusvirus* 屬專一性引子對。

為建立使用方便而且準確性高之 tobusvirus 快速檢測方法，我們嘗試調整 RT-PCR 的條件，但不論是使用 AMV 或 MMLV 反轉錄酶，亦或是改變 PCR 的黏合溫度（50 至 57 ），對檢測結果皆無顯著影響。為簡化植物 RNA 的純化步驟，同時避免因實驗操作時個人因素的影響而造成檢測結果的差異，因此我們嘗試改用 Viogene Plant Total RNA Extraction Miniprep System 純化植物全 RNA。實驗結果顯示在含有以 ammonium carbonate buffer 純化之植物 RNA 溶液中，所能檢測的最低量為 10 fg 之 RNA 轉錄體；當以 Viogene 套組純化之 RNA 取代時，則可檢測出至少 1 fg RNA 轉錄體，靈敏度提高至少 10 倍。由此可見，RNA 樣品的製備方式對 RT-PCR 的檢測結果有顯著影響。為了避免發生因為 RT-PCR 反應出錯無法增幅出產物，而誤判實驗結果為負反應，我們決定除了 T-F3 與 T-R3 引子對之外，應該加入可增幅 18S rRNA 的 18S rRNA-F/18S rRNA-R 引子對作為 RT-PCR 的對照組，同時改用市售的 RT-PCR 試劑（Ready-To-Go RT-PCR Beads），以減少人為錯誤的機率。綜合以上實驗結果，我們建立一套針對 *Tombusvirus* 屬的快速檢測方法，步驟包括以 Viogene 套組純化植物全 RNA，再以 T-F3/T-R3 與 18S rRNA-F/18S rRNA-R 兩對引子同時進行 RT-PCR，然後以凝膠電泳分析 RT-PCR 產物。所有的樣品都應該增幅出一條 555 bp 來自 18S rRNA 的 DNA 片段，代表整個檢測步驟沒有發生錯誤；若另有 959 bp 的 DNA 片段產生，表示樣品遭受 tobusvirus 感染。

為配合防檢局檢測進口萵苣是否含有 tobusvirus，我們發函請各分局協助採樣，結果新竹分局和高雄分局分別送件三次與十二次，共計 190 個萵苣樣品。當我們應用此方法檢測美國加州、越南和泰國之萵苣，結果未曾發現有 tobusvirus 感染的情形。因以前未曾有針對 *Tombusvirus* 屬而設計的檢測方法，所以本研究所發表的快速檢測方法為世界首例。我們預備將這一套 tobusvirus 快速檢測方法轉移給防檢局，未來可應用於多種植物的檢疫工作，以防止 tobusvirus 由國外入侵。

謝辭

本研究承行政院農委會動植物防疫檢疫局計劃經費補助，特致謝忱。

引用文獻

1. 徐世典、張東柱、張清安、蔡進來、蔡東纂. 2002. 臺灣植物病害名彙（第4版）. 386頁. 中華民國植物病理學會出版.
2. Allen, W. R. 1969. Occurrence and seed transmission of tomato bushy stunt virus in apple. *Canad. J. Plant Sci.* 49: 797-798.
3. Allen, W. R., and Davidson, T. R. 1967. Tomato bushy stunt from *Prunus avium* L. I. Field studies and virus characterization. *Canad. J. Bot.* 45: 2375-2383.
4. Bateson, M. F., and Dale, J. L. 1995. Banana bract mosaic virus: characterization using potyvirus specific degenerate PCR primers. *Arch. Virol.* 140: 515-527.
5. Bercks, R. 1967. er der Nachweis des Tomatenzwergbusch-Virus (tomato bushy stunt virus) in Reben. *Phytopath. Z.* 60: 273-277.
6. Cherif, C., and Spire, D. 1983. Identification du virus de rabougrissement buissonneux de la tomate (tomato bushy stunt virus) en Tunisie sur tomate, piment et aubergine: Quelques caracteristiques de la souche tunisienne. *Agronomie* 3: 701-706.
7. Donald, R. G. K., and Jackson, A. O. 1994. The barley stripe mosaic virus gb gene encodes a multifunctional protein that affects pathogenesis. *Plant Cell* 6: 1593-1606.
8. Fischer, H. U., and Lockhart, B. E. L. 1977. Identification and comparison of two isolates of tomato bushy stunt virus from pepper and tomato in Morocco. *Phytopathology* 67: 1352-1355.
9. Gerik, J. S., Duffus, J. E., Perry, R., Stenger, D. C., and van Maren, A. F. 1990. Etiology of tomato plant decline in the California desert. *Phytopathology* 80: 1352-1356.
10. Gibbs, A., and Mackenzie, A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 63: 9-16.
11. Grieco, F., Burgyan, J., and Russo, M. 1989. The nucleotide sequence of cymbidium ringspot virus RNA. *Nucl. Acids Res.* 17: 6383.

12. Hearne, P. Q., Knorr, D. A., Hillman, B. I., and Morris, T. J. 1990. The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus. *Virology* 177: 141-151.
13. Hollings, M., and Stone, O. M. 1977. Cymbidium ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 178.
14. Hollings, M., Stone, O. M., and Barton, R. J. 1977. Pathology, soil transmission and characterization of cymbidium ringspot, a virus from cymbidium orchids and white clover (*Trifolium repens*). *Ann. Appl. Biol.* 85: 233-248.
15. Kleinhempel, H., and Kegler, G. 1982. Transmission of tomato bushy stunt virus without vectors. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 17: 17-21.
16. Koenig, R., and Kunze, L. 1982. Identification of tombusvirus isolates from cherry in southern Germany as petunia asteroid mosaic virus. *Phytopath. Z.* 103: 361-368.
17. Koenig, R., and Lesemann, D. E. 1985. Plant viruses in German rivers and lakes. I. Tombusviruses, a potexvirus and carnation mottle virus. *Phytopath. Z.* 112: 105-116.
18. Langeveld, S. A., Dore, J.-M., Memelink, J., Derks, A. F. L. M., van der Vlugt, C. I. M., Asjes, C. J., and Bol, J. F. 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.* 72: 1531-1541.
19. Luis-Arteaga, M., Rodriguez-Cerezo, E., Fraile, A., Saez, E., and Garcia-Arenal, F. 1996. Different tomato bushy stunt virus strains that cause disease outbreaks in solanaceous crops in Spain. *Phytopathology* 86: 535-542.
20. Martelli, G. P. 1981. Tombusviruses. In "Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis" (E. Kurstak, Ed.), pp. 61-90. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
21. Martelli, G. P., Gallitelli, D., and Russo, M. 1988. Tombusviruses. In "The Plant Viruses" (R. Koenig, Ed.), Vol. 3, pp. 13-72. Plenum, NY.
22. Mowat, W. P. 1972. A necrotic disease of tulip caused by tomato bushy stunt virus. *Plant Path.* 21: 171-174.
23. Obermeier, C., Sears, J. L., Liu, H. Y., Schlueter, K. O., Ryder, E. J., Duffus, J. E., Koike, S. T., and Wisler, G. C. 2001. Characterization of distinct tombusviruses that cause diseases of lettuce and tomato in the western United States. *Phytopathology* 91: 797-806.
24. Rochon D. M., and Johnston, J. C. 1991. Infectious transcripts from cloned cucumber necrosis virus cDNA. Evidence for a bifunctional subgenomic mRNA. *Virology* 181: 656-65.
25. Rochon, D. M., and Tremaine, J. H. 1989. Complete nucleotide sequence of the cucumber necrosis virus genome. *Virology* 169: 251-259.
26. Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Petrokovski, S., McCallum, C. M., and Henikoff, S. 1998. Consensus degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucl. Ac Res.* 26: 1628-1635.
27. Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
28. Scholthof, H. B., Scholthof, K. G., and Jackson, A. O. 1995a. Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression cloning of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell* 7: 1157-1172.
29. Scholthof, H. B., Scholthof, K. G., Kikkert, M., and Jackson, A. O. 1995b. Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* 211: 324-328.
30. Smith, K. M. 1935. A new virus disease of tomato. *Nature* 135: 908.
31. Tomlinson, J. A., and Faithfull, E. M. 1984. Studies on the occurrence of tomato bushy stunt virus in English rivers. *Ann. Appl. Biol.* 104: 485-495.
32. van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. 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. *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* 1167pp. Academic Press, San Diego.
33. Zerbini, F. M., Koike, S. T., and Gilbertson, R. L. 1991. Biological and molecular characterization of lettuce mosaic potyvirus isolates from the Salinas Valley, California. *Phytopathology* 85: 726-752.

ABSTRACT

Chang, Y.-C.,^{1,2} Lee, S.-C.¹, and Lin, I.-J.¹ 2005. Development and application of a rapid detection method for the genus *Tombusvirus*. Plant Pathol. Bull. 14: 41-50. (¹ Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan; ² Corresponding author, E-mail: ycchang@ntu.edu.tw; Fax: +886-2-23620271)

Tombusviruses belonging to the family Tombusviridae, the genus *Tombusvirus*, are spherical, single-stranded, positive-sense RNA viruses. Several tombusviruses are economically important and none of them have been reported in Taiwan. To prevent import of tombusvirus-infected vegetables, fruits, seeds and seedlings from entering into Taiwan, we planned to develop a rapid detection method for tombusviruses, which can be used for plant quarantine. All sequences of tombusviruses were collected and those sequenced completely were chosen to do multiple sequence alignment. According to the results of amino acid sequence alignment of each gene, several conserved regions were selected to design tombusvirus genus-specific degenerate primers. In addition, we obtained the cDNA clones of *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) and *Cucumber necrosis virus* (CNV) from Dr. T. Jack Morris. From the results of polymerase chain reaction (PCR), all combinations of our genus-specific degenerate primers tested were able to amplify the expected products from the cDNA clones correctly. When the same primer pairs were used to perform reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with the mixture of plant total RNA and TBSV or CNV RNA transcripts, the outcome indicated that T-F3/T-R3 primers gave the best detection results. This primer pair was able to detect at least 1 fg of viral RNA transcripts within plant total RNA purified by Viogene kit, but only ten times less amount of RNA transcripts could be detected in plant total RNA purified by ammonium carbonate buffer. To establish a convenient, accurate and rapid detection method for tombusviruses, we tried to adjust the detection procedures by using Viogene kit to purify plant total RNA, and by performing the RT-PCR with T-F3/T-R3 primers plus 18S rRNA-specific primers which were used as a control. Accordingly, samples without tombusvirus should generate a 555-bp fragment from 18S rRNA by our detection method. Whereas, those tombusvirus-infected samples would produce a 959-bp RT-PCR product in addition to the 555-bp fragment. When we used this tombusvirus rapid detection method to check one hundred and ninety lettuce samples imported from USA, Vietnam and Thailand, none of them were found to be infected by tombusvirus. Because there is no detection method for the genus *Tombusvirus* published before, our method developed in this study is the first one and can be applied to many plants for tombusvirus detection.

Key words : the genus *Tombusvirus*, genus-specific degenerate primer, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)