

甜椒黃化輪紋斑點病之病毒分離與鑑定

姚國山 盧耀村

台中市 國立中興大學植物病理學研究所

接受日期：中華民國 82 年 3 月 29 日

摘 要

姚國山、盧耀村。1993。甜椒黃化輪紋斑點病之病毒分離與鑑定。植病會刊 2:57-65。

將田間出現黃化輪紋斑點病徵的甜椒葉片接種於紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn.)，經三次單斑分離後，將病毒回接至藍星甜椒 (*Capsicum annuum* L. cv. Blue-Star)，可造成與田間相同之病徵。此病毒經接種於 9 科 35 種寄主後，發現能感染藜科 (Chenopodiaceae)、紫花酢醬草科 (Oxalidaceae)、茄科 (Solanaceae)、豆科 (Leguminosae)、莧科 (Aizoaceae) 和葫蘆科 (Cucurbitaceae) 等 6 科 26 種植物。在 *Nicotiana glutinosa* L.、矮牽牛 (*Petunia hybrida* Vilm.) 及奎藜 (*C. quinoa* Willd.) 上，能引起壞疽病斑和針狀 (pin-point) 小壞疽病斑，此特性與國外所報告之番茄斑點萎凋病毒辣椒分離株引起之病徵及寄主範圍類似，然而在 *N. benthamiana* Domin. 之接種葉所產生的黃化斑點病徵則有所不同。經由 Sepharose CL-6B 管柱分子篩孔色層分析所得之試液，汁液接種至原寄主測定病原性，以及利用電子顯微鏡觀察，可發現大小在 70-120 nm 之間，且具有套膜的球形病毒粒子。回接的甜椒病葉經超薄切片後以電子顯微鏡觀察，可在細胞質中發現多數大小與外形相同之球形病毒粒子。此結果顯示本試驗所獲病毒與國外所報告之 Bunyaviridae 科之 *Tospovirus* 屬的病毒特性極為接近，可能為相同之病毒。此外，再由免疫分析結果，發現本試驗分離所得病毒與國外報告之番茄斑點萎凋病毒的萵苣系統 (tomato spotted wilt virus-lettuce, TSWV-L) 血清具有陽性反應，而與鳳仙花系統 (TSWV-I) 無反應，因此推測本試驗分離所得之病毒，應屬於番茄斑點萎凋病毒萵苣系統之台灣分離株。

關鍵詞：甜椒，番茄斑點萎凋病毒，*Tospovirus*。

緒 言

甜椒俗稱青椒、大同仔，為外來蔬菜類番椒的一品系，是常見之茄科 (Solanaceae) 重要蔬菜，原產於南美洲秘魯和中美洲墨西哥一帶 (5)，在本省主要產地為中部之南投、彰化、雲林，南部之台南、屏東，以及東部之花蓮等地 (6)。根據 Green and Kim (18) 報告指出，目前全世界已知為害甜椒的植物病毒約有 45 種，分別屬於三個長絲狀病毒群的 Potyvirus，Potexvirus，Carlavirus，和二個短桿狀的病毒群的 Tobamovirus，Tobravirus，以及十二個球形病毒群的 Alfalfa mosaic virus, Cryptic virus, Cucumovirus, Fabavirus, Geminivirus, Ilarvirus, Luteovirus, Nepovirus, Tobacco necrosis virus, Tombusvirus, *Tospovirus* 和 Tymovirus 等，共十七個已知的病毒群屬。在田間生長

的甜椒容易發生病毒複合感染，一般常見的病徵包括嵌紋、斑駁、葉皺縮 (leaf distortion)，矮化和輪點等，造成甜椒栽培上嚴重損失。

在本省早期有關感染番椒的病毒報告，只有林 (1) 利用電子顯微鏡，觀察辣椒病株上之病毒粒子的形態，以及依寄主反應之結果，發現有 tobacco mosaic virus (TMV) 與 potato virus Y (PVY) 的存在。1977 年林 (2) 在甜椒上發現屬於豆科系統 (strain) 的 cucumber mosaic virus (CMV)。後來李 (3) 依甜椒植株不同的病徵表現，分成黃化、斑駁、葉側緣帶、葉脈皺縮及葉片上捲、頂端側芽叢生和壞疽等 6 種不同病徵型，並分離到 tomato mosaic virus (ToMV), pepper mosaic virus (PeMV), potato virus S (PVS)，和 CMV 以及一些未鑑定的 Potyvirus 群病毒。近來陳 (4) 將辣椒依病徵表現不同，而分成脈側緣嵌紋、小葉扭曲及黃化斑

駁等三種，並分離出 ToMV、potato virus X (PVX) 及 PeMV 等三種病毒。另外，Green 等 (17) 指出較常為害本省甜椒的病毒分別是 CMV、PVY、TMV 和 chili veinal mottle virus (CVMV) 等四種病毒。後來 Green and Wu (19) 亦在本省田間之甜椒上偵測到 tobacco mild green mosaic virus (TMGMV) 的存在。

本試驗主要目的，在分離田間造成甜椒黃化輪紋斑點病的病毒，並利用汁液接種作寄主反應測試、電子顯微鏡觀察，及雙抗體酵素連結抗體 (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) 法，鑑定其種類，以供抗病育種之參考。

材料與方法

病毒來源

八十年間自大南種苗場附近田間，採回呈現黃化並有輪紋斑點的甜椒病葉，以 10 倍量 (w/v) 之 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 研磨，經汁液機械接種至矮牽牛、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Farmers 301)、*N. benthamiana*、*N. glutinosa* 和紅藜及藍星甜椒等判別植物，並將接種後第六天在紅藜接種葉出現之小壞疽病斑，經連續三次單斑分離，再回接於藍星甜椒幼株上保存，供為本試驗之病毒接種源。

寄主反應測試

取初發病四天之甜椒病葉，以上述接種法接種於番杏科 (Aizoaceae)、莧科 (Amaranthaceae)、藜科 (Chenopodiaceae)、葫蘆科 (Cucurbitaceae)、豆科 (Leguminosae)、茄科 (Solanaceae)、菊科 (Compositae)、石竹科 (Caryophyllaceae)、和紫花酢醬草科 (Oxalidaceae) 等 9 科 35 種判別植物 (表一)，連續 2-3 週觀察病徵之表現，並且利用電子顯微鏡以陰染法觀察有無病毒粒子之侵入感染。

病毒之純化

參考 Joubert 等 (21) 和 Tsuda 等 (23) 之方法，取接種 7 天之甜椒病葉 20 g，以 6 倍量 (W/V) 0.1 M 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 內含 0.01 M EDTA 和 0.01 M 亞硫酸鈉研磨，經四層紗布過濾後，10,000 g 離心 15 min，收集上澄液，以 25% 蔗糖溶液做墊襯 (cushion)，再經 100,000 g 離心 90 min 後，所得沉澱物以 3 ml 之 0.02 M 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 內含 0.01 M EDTA 及 0.1% (W/V) 之 L-cysteine 懸浮。經 10,000 g 離心 10 min，去除變性不溶物。再以 2 ml 之 15% 蔗糖溶液做墊襯，經 64,000 g (Hitachi RPS 50-2) 離心 45 min，取 1 ml 具蛋白光之上澄液，再以凝膠過濾法 (gel filtration) 做

進一步純化。即將上澄液流經事先以 0.02 M 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 平衡的 Sepharose CL-6B 凝膠之管柱 (0.9 × 60 cm)，並以同樣緩衝液流出，流速為 0.3 ml/min，在波長 254 nm 的紫外光監視器 (LKB4700 UVCORD) 及記錄器 (LKB) 下監視與記錄，每管收集 1 ml，收集至透光度回歸 100% 為止。依照記錄器顯示的曲線，分別收集具吸收峰之試液，利用陰染法染色，在電子顯微鏡下觀察以判定病毒存在之吸收峰位置。同時並將試料接種至甜椒幼苗，依病原性測知病毒存在之吸收峰位置。

電子顯微鏡觀察

直接陰染法：參考 Christie 等 (8) 利用 2% 醋酸鈾陰染試料，在電子顯微鏡下觀察病毒粒子形態的方法，即直接取經 Sepharose CL-6B 管柱部分純化後，收取在 254 nm 下具有吸收值試液，或直接切取經由接種後發病的罹病組織，以及經接種而無病徵出現之葉片，切成大小約 2 × 2 mm 大小，以 20 μl 之磷酸緩衝液 (pH 7.2) 研磨，取 3 μl 之粗汁液置於銅網上，經 3 min 後，再以 10 滴去離子水洗去雜質，利用 2% 醋酸鈾染色 10 sec，以電子顯微鏡 (JEOL200 CX) 觀察有無病毒粒子的存在。

超薄切片法：參考 Yeh 等 (24) 包埋固定西瓜罹病組織的方法，即將發病之甜椒葉片，切成 1.5 mm × 1.5 mm 大小，置於含 2% 戊二醛 (glutaraldehyde) 之 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 內，4 C 固定過夜後，以 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 水洗三次，每次 10 min，再以 1% 四氧化錳 (tetroxide) 於 4 C 下行後固定 2 hr，重覆上述水洗三次，經 50%，70%，85%，95% 和 100% 酒精系列脫水後，加入 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 和 LR White 等體積混合之試液，於室溫下滲透過夜，再重新加入 LR White，於室溫下滲透 24 hr，最後將材料置於膠囊內，以 LR White 包埋，放在 60 C 的烘箱中 28 hr，待其聚合硬化後，以超薄切片機 (Recheiot-Jongmodel Ultracut E) 切取 80 nm 厚的組織切片，利用 2% 醋酸鈾染色 20 min，60 滴無菌水流洗後，再以檸檬酸鉛 (lead citrate) 染色 5 min，重覆水洗步驟，最後在電子顯微鏡下觀察病毒粒子之形態。

雙抗體三明治式酵素連結抗體反應 (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay; DAS-ELISA)

參考 Clark and Adams (9) 以及 Davis 等 (10) 利用 DAS-ELISA 偵測植物病毒的方法，以購自 Agdia 公司的番茄斑點萎凋病毒的鳳仙花系統 (TSWV-I) 及萵苣系統 (TSWV-L) 之抗體測試本試驗所分離之病毒。其步驟如下，即以 coating buffer (1 L 中含 1.59 g

表一、呈現黃化輪紋斑點病徵之甜椒所分離之病毒在寄主植物上之反應

TABLE 1. Reactions of test plants after inoculation with the virus isolated from sweet pepper showing chlorotic ringspot

Test plants	Reaction ¹	
	Inoculated leaves	Systemic leaves
Aizoaceae		
<i>Tetragonia expansa</i> Thunb.	—	—
Amaranthaceae		
<i>Amaranthus viridis</i> L.	CL	—
<i>Gomphrena globosa</i> L.	CL	—
Caryophyllaceae		
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	—	—
<i>Dianthus chinensis</i> L.	—	—
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn.	L (pinpoint)	—
<i>Chenopodium serotinum</i> L.	L	—
<i>Chenopodium murale</i> L.	L	—
<i>Chenopodium guinoa</i> Willd.	CL	—
Compositae		
<i>Dahlia pinnata</i> Cav.	—	—
<i>Wedelia biflora</i> (L.) DC.	—	—
<i>Youngia taiwaniana</i>	—	—
Cucurbitaceae		
<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad. cv. Ten-Bow	NL	—
<i>Cucumis metuliferus</i> L.	L	—
<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	—	—
<i>Luffa cylindrica</i> Roem.	—	—
Leguminosae		
<i>Cassia occidentalis</i> L.	NL	—
<i>Vigna sinensis</i> (L.) Savi ex Hassk.	CL	—
<i>Vicia faba</i> L.	NL	—
Oxalidaceae		
<i>Oxalis corymbosa</i> DC.	NL	—
Solanaceae		
<i>Capsicum annuum</i> L. var. Blue-Star	CS	D,R
<i>Datura metel</i> L.	L	M
<i>Datura stramonium</i> L.	L	M,R
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. Fortune	CS	D,S,Mo
<i>L. esculentum</i> cv. Pearl	CS	D,S,Mo
<i>L. esculentum</i> cv. Farmers 301	CS	D,S,Mo
<i>L. esculentum</i> cv. 黑柿	CS	D,S,Mo
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.	CS,	D,Mo
<i>Nicotiana debneyii</i> L.	NL	M
<i>Nicotiana glauca</i> Spreng.	CS	Mo,D
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	LLL	M
<i>Nicotiana rustica</i> L.	L	M
<i>Nicotiana tabacum</i> L. Samsun	NL	M
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	BL	—
<i>Physalis floridana</i> Rydberg.	—	—
<i>Solanum melongena</i> L.	CS	—

¹ BL= brown local lesion, CL= chlorotic local lesions, CS= chlorotic spots, D= distortion, LLL= Large local lesions, L= local lesions, M= mosaic, Mo=mottling, NL= necrotic local lesions, R= ringspots, S= stunt, —= no infection.

Na_2CO_3 , 2.93 g NaHCO_3 , 0.2 g NaN_3) 稀釋 1,000 倍抗體 IgG 後，每洞加入 200 μl 於 ELISA 微量盤 (Corning ELISA Plate) 中，4 $^{\circ}\text{C}$ 下過夜，再以洗滌緩衝液 (1 L 含 8 g NaCl , 1.15 g Na_2HPO_4 , 0.2 g KH_2PO_4 , 0.2 g KCl , 0.2 g NaN_3 ，和 0.5 ml Tween-20; PBST) 重複清洗三次後，以含有 2% polyvinylpyrrolidone MW 40,000，和 0.01 M Na_2SO_3 之 PBST 10 倍量 (W/V)，研磨製備甜椒罹病葉片粗汁液，再以同樣緩衝液稀釋成 10^2 ， 10^3 和 10^4 四種濃度後，每洞分別加入 200 μl ，37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 6 hr，重複以 PBST 清洗三次後，每洞再分別加入同量以 conjugated buffer (PBST 內含 2% polyvinylpyrrolidone MW 40,000, 0.2% BSA, 0.02% NaN_3) 稀釋 1,000 倍之上述抗體免疫球蛋白標識鹼性磷酸酶 (immunoglobulin alkaline phosphatase conjugate, Sigma) 之試液，37 $^{\circ}\text{C}$ 下 6 hr，重複 PBST 清洗步驟，每洞再加入等量之鹼性磷酸酶基質試液 (p-nitrophenyl phosphate disodium, Sigma)，反應 60 min 後，每洞加入 50 μl 之 3 M NaOH 停止反應，以 ELISA reader (Dynatech Laboratories Inc. MR 700) 在波長 405 nm 測其吸收值。

結 果

寄主反應

經三次紅藜連續單斑分離之病原，機械接種於 9 科 35 種不同之寄主植物，其結果如表一，即總共 6 科 26 種有病徵之表現。甜椒於接種後第四天，於接種葉產生不明顯之黃斑，隨後黃斑逐漸明顯，至第十天在黃斑外圍有輪環產生，心葉處則出現不明顯黃點和皺縮的現象 (圖一 A)。 *N. glutinosa* 在接種第四天出現大型壞疽病斑 (圖一 B)， *N. benthamiana* 則於接種後第五天，在接種葉出現不明顯黃化斑點，第八天心葉出現皺縮斑駁病徵 (圖一 C)。在番茄農友 301 (圖一 D)、雙喜、聯珠、和黑柿等四品種，皆於接種後第四天，在接種葉出現黃化斑點，第十天心葉則產生斑駁且變小，葉柄有水浸狀條斑壞疽出現，後期植株明顯矮化。在紅藜及牽藜於接種後第六天，出現針狀 (pin-point) 小形壞疽病斑和黃化局部病斑 (圖一 E)。矮牽牛則於接種後第三天，在接種葉出現局部的壞疽病斑 (圖一 F)。

此外，其它指示植物的反應，如在 *N. debnyii* L. 之接種葉上，於接種第七天後出現壞疽病斑，在 *N. tabacum* L. Samsun 於接種葉出現壞疽病斑，茄子則在接種第六天，於接種葉上會出現黃化病斑，而第十一

天則會出現壞疽病斑，而在西瓜天寶 (*Citrullus vulgaris* Schrad.) 及刺角瓜 (*Cucumis metuliferus*) 則在接種葉出現壞疽局部病斑，但是在南瓜 (*Cucurbita moschata* Duch.) 和絲瓜 (*Luffa cylindrica* Roem.) 則不會有病徵的出現 (表一)，另外，再將無病徵之指示植物，直接以電子顯微鏡觀察有無病毒粒子的存在，或經回接紅藜觀察是否具有病原性，結果均無病毒粒子或病原性的發現。

電子顯微鏡觀察

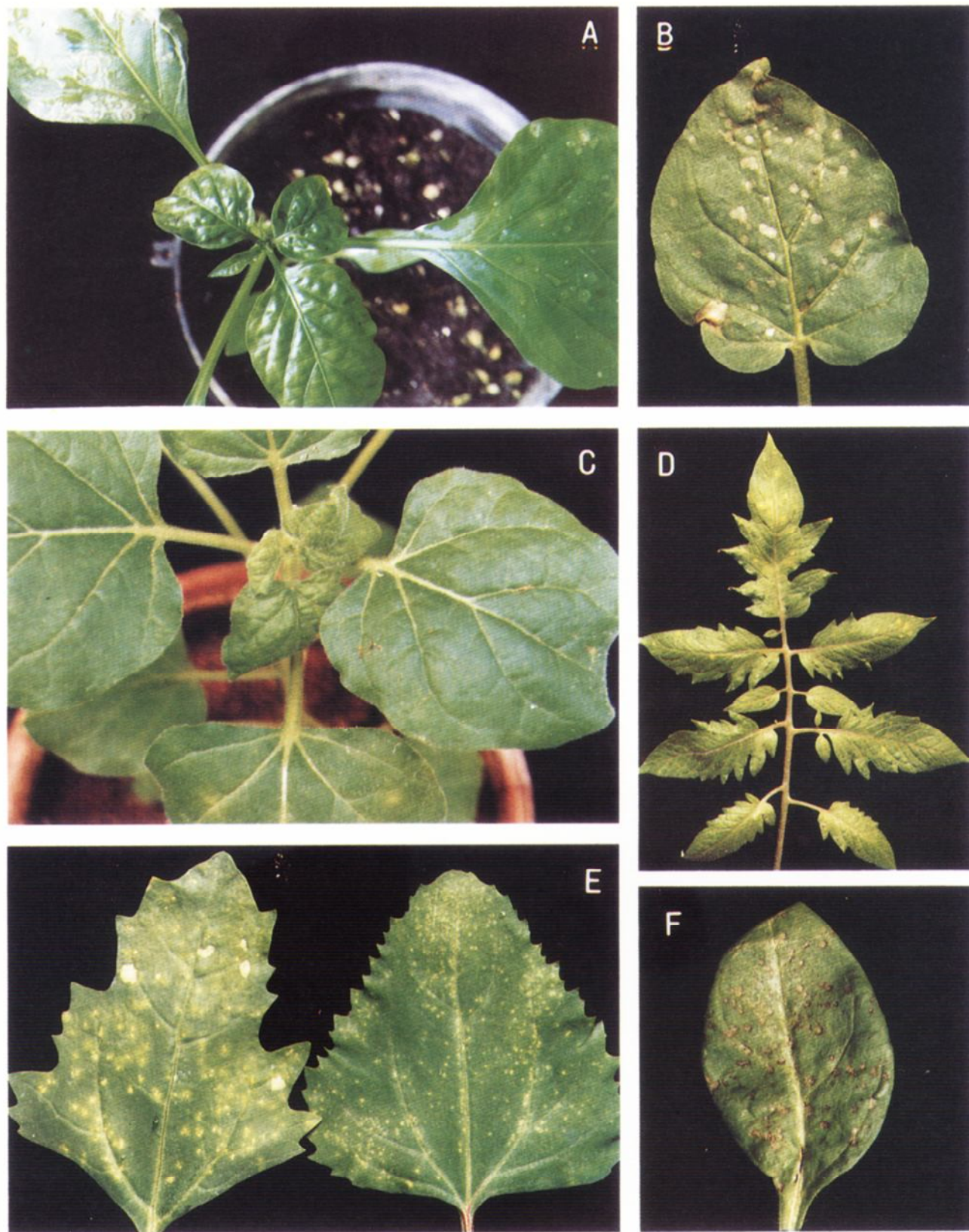
取經機械接種後，出現黃化輪紋斑點的甜椒病葉，或經接種後無病徵表現之指示植物，直接以陰染法觀察有無病毒粒子的存在，結果在罹病葉發現具有外套膜之球形病毒，而無病徵表現之植株或對照健全植株則無此球形病毒粒子的存在。另外，利用超薄切片法，所得之組織切片，經醋酸鈾和檸檬酸鉛雙重染色增加對比後，在電子顯微鏡下觀察，發現在甜椒病葉的細胞質中，存在多數具有外套膜的球形病毒粒子 (圖二 A, B)，直徑約為 70–100 nm 之間 (圖三)，而細胞壁及細胞核內，則未發現有此種粒子存在，同時對照組的健全植株，亦無法觀察到此種粒子的存在。

病毒之純化

經由超高速離心如方法所述，分離濃縮後所得之試液，再利用分子篩孔 Sepharose CL-6B 管柱加以純化，在波長 254 nm 監視下得到三個不同分子量的吸收峰，分別利用甜椒幼苗接種測試其病原性與電子顯微鏡以陰染法直接觀察，發現只有在第一吸收峰試液，具有病原性的存在，而第二和第三吸收峰並不具有病原性。同時再經由電子顯微鏡觀察後發現，有病原性存在之試料中，可觀察到多數具有外套膜的球形病毒粒子存在 (圖二 C)，病毒粒子之大小約在 70–120 nm 之間 (圖三)，而第二與第三吸收峰試液，則只能觀察到不定形的粒子。

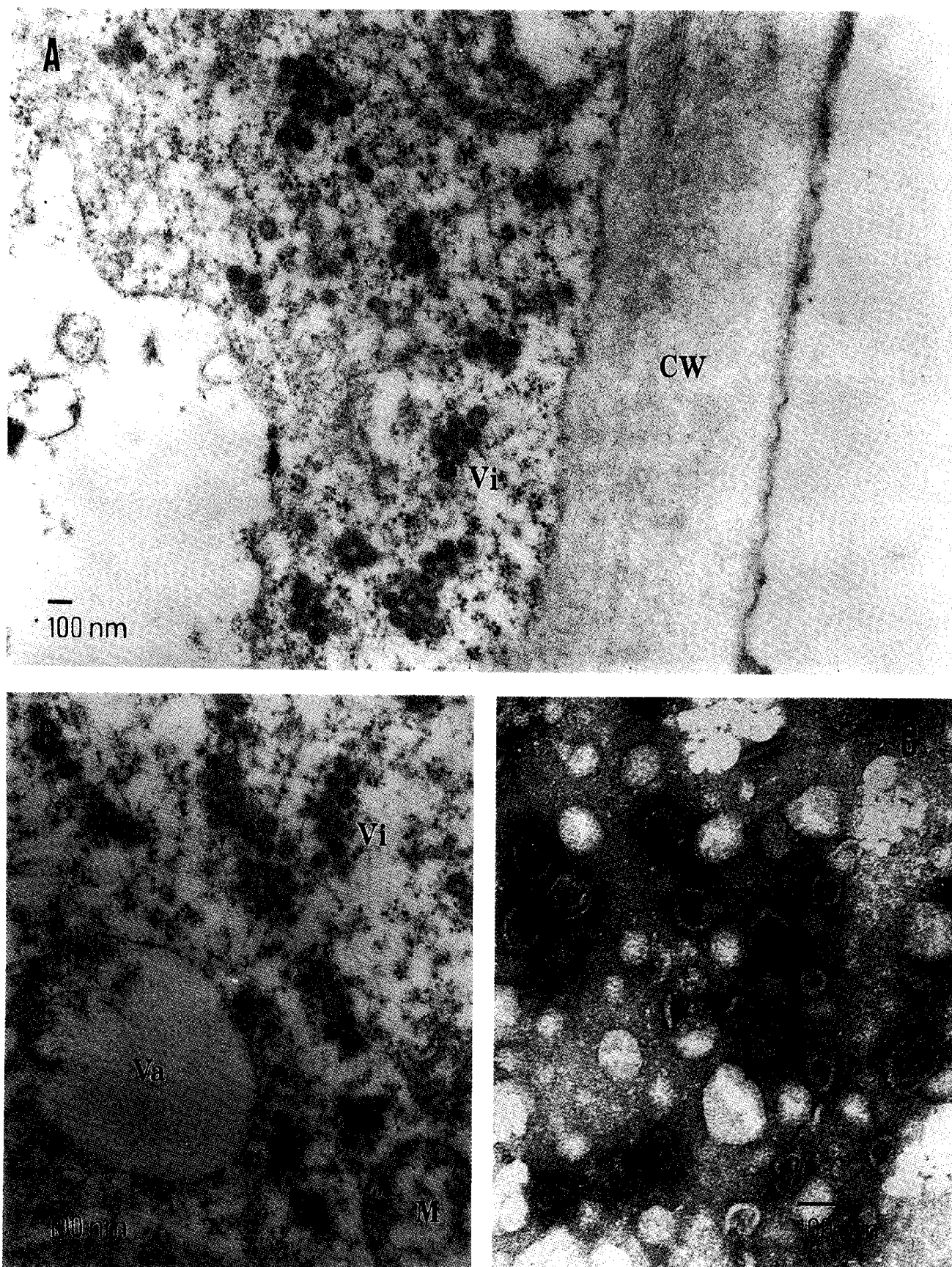
雙抗體三明治式酵素連結抗體反應

由呈現黃化輪紋斑點病徵之甜椒植株，分離獲得具有外套膜的大球形病毒，其寄主範圍與電子顯微鏡觀察病毒形態等特性，和 *Tospovirus* 屬的番茄斑點萎凋病毒 (TSWV) 相類似。因此，為要瞭解本試驗所分離的病毒與國外報告之番茄斑點萎凋病毒之萬芑系統 (TSWV-L) 和鳳仙花系統 (TSWV-I) 二者間的血緣關係，所以利用 DAS-ELISA 法進行偵測，結果如圖四所示，本病毒與 TSWV-L 系統血清有陽性反應，而與鳳仙花系統並無血緣關係的存在。



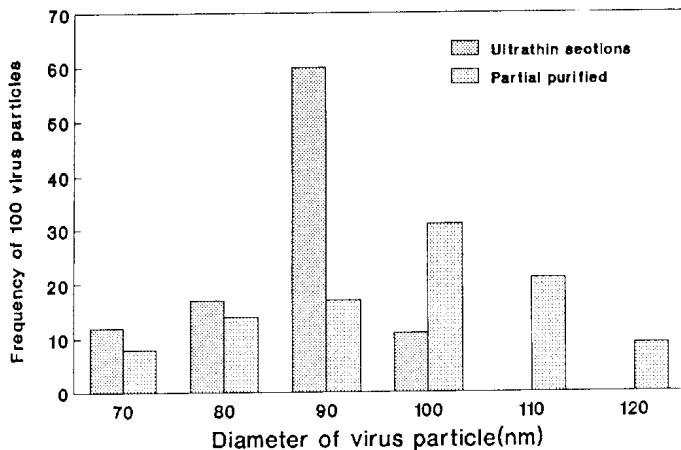
圖一、由呈現黃化輪紋斑點病徵之甜椒所分離之病毒在不同寄主上之病徵。(A)甜椒(藍星)下位葉出現黃化輪紋斑點，心葉不明顯斑點及皺縮，(B) *Nicotiana glutinosa* 出現大形灰色病斑，(C) *N. benthamiana* 出現黃化斑點與心葉皺縮，(D)番茄(農友301)出現黃化斑點病斑，(E)紅藜(右)出現針狀局部病斑，奎藜出現黃化局部病斑；(F)矮牽牛出現褐色局部病斑。

Fig. 1. Symptoms induced by virus isolated from sweet pepper showing chlorotic ringspot symptoms. (A) Sweet pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Blue-Star) showing chlorotic ringspots on lower leaves, and inconspicuous chlorotic spots and distortion on upper leaves; (B) Large gray local lesions on *Nicotiana glutinosa* leaf; (C) Leaves of *N. benthamiana* showing chlorotic spots and distortion; (D) Chlorotic spots on a leaf of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Farmers 301); (E) Pinpoint and chlorotic local lesions on leaves of *Chenopodium amaranticolor* (right) and *C. quinoa* (left), respectively; (F) Brown local lesions on a leaf of *Petunia hybrida* Vilm.



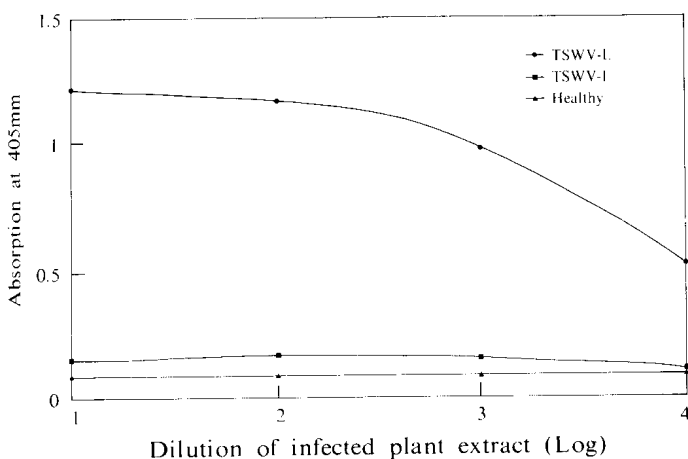
圖二、由呈現黃化輪紋斑點病徵之甜椒所分離之病毒在甜椒(藍星)病葉之分布與粒子形態。(A,B)超薄切片，(C)經 Sepharose CL-6B 管柱純化後之病毒粒子。

Fig. 2. Particle morphology of the virus isolated from diseased sweet pepper showing chlorotic ringspots. (A,B) Ultrathin sections from infected leaves; (C) Virus particles purified through Sepharose CL-6B column. Vi: virion, CW: cell wall, Va: vacuole, M: mitochondria.



圖三、由呈現黃化輪紋斑點病徵之甜椒所分離之病毒經 Sepharose CL-6B 管柱純化和超薄切片之病毒粒子大小分布。

Fig. 3. Particle distribution of the virus isolated from sweet pepper showing chlorotic ringspot measured from Sepharose CL-6B column purified virus (gray) and ultrathin sectioning (light gray).



圖四、由呈現黃化輪紋斑點病徵之甜椒所分離之病毒之 DAS-ELISA 反應。

Fig. 4. The virus isolated from sweet pepper showing chlorotic ringspot was detected by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies against lettuce or impatiens strains of tomato spotted wilt virus. Antisera were used at a 1:1,000 dilution. The antigen was extracted from virus-infected plants of sweet pepper, and diluted by a 10-fold series with PBST containing 2% (V/V) polyvinylpyrrolidone and 0.01 M Na_2SO_3 . Alkaline phosphatase labeled rabbit immunoglobulin (IgG) was used at a 1:1,000 dilution. Results were read 60 min after the addition of the substrate.

討 論

由田間甜椒罹患黃化輪紋斑點之植株葉片，分離所得之病毒，經接種 9 科 35 種指示植物發現能感染其

中藜科、紫花酢醬草科及茄科等 6 科 26 種植物 (表一)，此特性與 de Avila 等 (15) 從西班牙之辣椒 (pepper) 病株所分離之番茄斑點萎凋病毒分離株之寄主範圍類似，二病毒均可在藜科引起接種葉之壞疽針狀小病斑，在豆科引起壞疽、或黃化病斑，在 *N. glutinosa* 和矮牽牛接種葉出現壞疽病斑，而在甜椒初期造成黃化斑點，後期出現輪紋病徵。但是本試驗所得之病毒在 *N. benthamiana* 植株上初期產生黃化病斑，後期則產生心葉皺縮斑駁的病徵則與 de Avila 等 (15) 報告之特性相異。另外，本病毒不能系統性感染葫蘆科作物，與本省已報告 (24) 能系統性感染西瓜之番茄斑點萎凋病毒相異，而和 TSWV-L 與 TSWV-I 二分離株相同，能使得葫蘆科產生局部病斑反應。Brown 等 (7)，Ie (20) 以及 Peters (22) 曾報告指出，診斷番茄斑點萎凋病毒分離株的有利指示植物為 *N. glutinosa*、奎藜和矮牽牛，分別能產生大形或小形如針狀 (pin-point) 壞疽病斑，以及黑或棕色的局部壞疽病斑。而本病毒在 *N. glutinosa*、奎藜和矮牽牛等三種指示植物的病徵反應，亦皆與上述報告所述類似。

病葉經超高速離心分離，並經 Sepharose CL-6B 管柱進一步純化之試液，以電子顯微鏡觀察發現具有套膜的球形病毒粒子存在，其大小約在 70–120 nm 之間。另外，將甜椒罹病葉超薄切片置電子顯微鏡下觀察，亦可在細胞質中，發現多數具有外套膜直徑約在 70–100 nm 之間的球形病毒粒子。此種形態的病毒粒子與 Francki 等 (16) 所述動物病毒中的 Bunyaviridae 科之 *Tospovirus* 屬具有外套膜大小為 80–100 nm 的病毒粒子相似。

Francki 等 (16) 根據番茄斑點萎凋病毒之粒子形態，媒介傳播形式，基因組成，和基因轉譯策略等，而將它歸類在動物病毒中的 Bunyaviridae 科之 *Tospovirus* 屬中。de Avila 等 (11,13,14) 曾利用番茄斑點萎凋病毒之核鞘蛋白 (nucleocapsid protein) 所製備之多元抗體和單元抗體，以 ELISA 方法偵測 20 個分離株，而將它們區分為 I，II，和 III 等三個 serogroup，其中 serogroup I 分離株與 serogroup II 抗體之間會有弱反應，但 serogroup I 分離株不與 serogroup III 抗體反應。de Avila 等 (12) 再比較三個 serogroup 的核鞘蛋白基因序列，發現 serogroup I 與 serogroup III 之間，核苷酸序列只有 55.9% 的同源性 (homology)，而 serogroup I 與 serogroup II 有 75% 的同源性，serogroup II 與 serogroup III 則亦只有 57% 的同源性。因此認為 *Tospovirus* 屬中的 serogroup I 是典型的 TSWV；serogroup II 含番茄黃化斑點病毒 (tomato chlorotic spot virus, TCSV) 和花生輪點病毒 (groundnut ringspot virus, GRSV)；而 serogroup III 是鳳仙花壞疽斑點病毒 (impatiens necrotic spot virus, INSV)。

由 DAS-ELISA 法反應結果得知，本試驗分離所得具外套膜之球形病毒，與國外所報告的番茄斑點萎凋病毒萵苣系統病毒 (TSWV-L) 的抗血清呈陽性反應，而和鳳仙花系統病毒 (TSWV-I)，即上述所稱的 INSV 之抗血清並無反應，顯示本病毒與國外所報告之番茄斑點萎凋病毒萵苣系統病毒具有血緣關係。

綜合以上，於發生黃化輪紋斑點病徵之甜椒，所分離之病毒，其寄主範圍、電子顯微鏡觀察所得之粒子形態與大小、以及 DAS-ELISA 法反應等結果顯示，此病毒應屬於番茄斑點萎凋病毒萵苣系統之台灣分離株。

謝 辭

承蒙種子檢查室吳榮小姐，提供來自國外的番茄斑點萎凋病毒鳳仙花系統之抗血清，屏東技術學院陳滄海教授代為偵測萵苣系統，以及本系紀慶隆先生超薄切片的協助，謹此誌謝。本文在農委會 80-81 科技-2.3-糧-02 計劃經費支援下所完成，亦謹表謝忱。

引用文獻

- 林長青. 1974. 台灣主要茄科蔬菜毒素病種類之鑑定及電子顯微鏡觀察. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 60 頁。
- 林納生. 1977. 甜椒嵌紋毒素病病原病毒 -CMV 之一系統之研究. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 86 頁。
- 李成蕊. 1980. 台灣甜椒毒素病病原分離與鑑定. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 49 頁。
- 陳滄海. 1982. 為害台灣辣椒三種長形病毒之研究. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 86 頁。
- 張武南. 1980. 甜椒、辣椒. P.1018-1021. 台灣農家要覽. 豐年社出版. 台北. 1388 頁。
- 農林廳農業經濟科. 1990. 台灣農業年報. 台灣省政府農林廳出版. 南投. 382 頁。
- Brown, L. G., Simone, G. W., and Christie, R. G. 1990. Diagnostic strategy development for tomato spotted wilt virus. Pages 94-99 in: The United States Department of Agriculture Workshop on Virus-Thrips-Plant Interaction of Tomato Spotted Wilt Virus. H. T. Hsu, and R. H. Lawson eds. 170 pp.
- Christie, S. R., Purcifull, D. E., Crawford, W. E., and Ahmed, N. A. 1985. Electron Microscopy of Negatively Stained Clarified Viral Concentrates Obtained from Small Tissue Samples with Appendices on Negative Staining Techniques. Fla. Agr. Sta. Bull. No. 872. 45 pp.
- Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.
- Davis, R. F., De Herrera, V., Gonzales, L., and Sutula, C. 1990. Use of strain specific monoclonal and polyclonal antibodies to detect two serotypes of tomato spotted wilt virus. Pages 153-162 in: The United States Department of Agriculture Workshop on Virus-Thrips-Plant Interaction of Tomato Spotted Wilt Virus. H. T. Hsu, and R. H. Lawson eds. 170 pp.
- de Avila, A. C., de Haan, P., Kitajima, E. W., Kormelink, R., Resende, R. de O., Goldbach, R. W., and Peters, D. 1992. Characterization of a distinct isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. J. Phytopathol. 134:133-151.
- de Avila, A. C., de Haan, P., Kormelink, R., Resende, R. de O., Goldbach, R. W., and Peters, D. 1993. Classification of Tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. J. Gen. Virol. 74:153-159.
- de Avila, A. C., de Haan, P., Smeets, M. L. L., Resende, R. de O., Kitajima, E. W., Goldbach, R. W., and Peters, D. 1992. Distinct levels of relationships between tospovirus isolates. Pages 83-105 in: Diversity of Tospoviruses. A. C. de Avila ed. 136 pp.
- de Avila, A. C., Huguenot, C., Resende, R. de O., Kitajima, E. W., Goldbach, R. W., and Peters, D. 1990. Serological differentiation of twenty isolates of tomato spotted wilt virus (TSWV). J. Gen. Virol. 71:2801-2807.
- de Avila, A. C., Pena, L., Kitajima, E. W., Kormelink, R., Resende, R. de O., Goldbach, R. W., and Peters, D. 1991. Characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV), isolated from *Capsicum annuum* L. in the Canary Islands. Phytopathologia Mediterranea 30:23-28.
- Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., and Brown, F. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Arch. Virol. Sup. 2. Springer-Verlag Wien & New York, 450 pp.
- Green, S. K., Lee, D. R., and Kuo, Y. J. 1987. Progress Report. AVRDC, Shanhu, Tainan, Taiwan, R.O.C. 482 pp.
- Green, S. K., and Kim, J. S. 1991. Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers, a Literature Review. AVRDC. Technical Bull. No. 18, 60 pp.
- Green, S. K., and Wu, S. F. 1991. Tobamoviruses on *Capsicum annuum* in Taiwan. Plant Dis. 75:1186 (Abstr.).
- Ie, T. S. 1970. Tomato spotted wilt virus. C. M. I./A. A. B. Descriptions of Plant Viruses. No. 39. 4 pp.

21. Joubert, J. J., Hahn, J. S., von Wechmar, M. B., and van Regenmortel, M. H. V. 1974. Purification and properties of tomato spotted virus. *Virology* 57:11-19.
22. Peters, D., de Avila, A. C., Kitajima, E. W., Resende, R. de O., de Haan, P., and Goldbach, R. W. 1990. Pages 1-14 in: The United States Department of Agriculture Workshop on Virus-Thrips-Plant Interaction of Tomato Spotted Wilt virus. H. T. Hsu, and R. H. Lawson eds. 170 pp.
23. Tsuda, S., Natsuaki, K. T., and Tomaru, K. 1991. Purification of tomato spotted wilt virus isolated from tobacco plants in Morioka, Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 57:239-246.
24. Yeh, S. D., Lin, Y. C., Cheng, Y. H., Jih, C. L., Chen, M. J., and Chen, C. C. 1992. Identification of tomato spotted wilt-like virus on watermelon in Taiwan. *Plant Dis.* 76:835-840.

ABSTRACT

Yao, K. S., and Lu, Y. T. 1993. Isolation and identification of a virus causing chlorotic ringspot symptom on sweet pepper in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 2:57-65. (Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Sweet pepper plants showing chlorotic ringspot symptom were collected from field in Taichung area in 1991. A virus isolate was obtained by three successive single lesion transfers on *Chenopodium amaranticolor*. To determine the host range, back-inoculated *Capsicum annuum* L. cv. Blue-Star was used as virus inoculum and inoculated to 35 plant species of 9 families. The results showed that the virus infected 26 plant species in Chenopodiaceae, Oxalidaceae, Solanaceae, Leguminosae, Aizoaceae, and Cucurbitaceae. Chlorotic or pin-point local lesions were observed on *Nicotiana glutinosa*, *Petunia hybrida*, and *C. quinoa*. The host range and reactions were similar to those of the reported pepper isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV-P). The virus however caused chlorotic spots on inoculated leaves of *N. benthamiana*, distinct from TSWV-P isolate. The virus was partially purified by Sepharose CL-6B column chromatography, and then eluted with 0.02 M potassium phosphate buffer containing 0.01 M EDTA, and 0.1% (W/V) L-cysteine, pH 7.0. Virus infectivity was confirmed by back inoculation to pepper plants. Electron microscopy of negatively stained purified virus or virus particles present in ultrathin sections from leaves of diseased pepper revealed that the morphology of virus was roughly enveloped spherical with diameter ranging from 70–120 nm, indicating that it belongs to *Tospovirus* genus of arthropod-borne Bunyaviridae. In addition, serological tests by enzyme-linked immunosorbent assay with polyclonal antibodies against different serotypes of tospovirus demonstrated that the virus was serologically related to the L-serotype of *Tospovirus*. Evidences from this study suggest that the virus inducing chlorotic ringspot on sweet pepper is a new isolate of TSWV previously not found in Taiwan.

Key words: Sweet pepper, Tomato spotted wilt virus, *Tospovirus*.