

研究簡報

菜豆黃化嵌紋病毒及胡瓜嵌紋病毒在唐菖蒲葉片
之分佈及其對病毒檢測之影響

陳金枝¹ 張清安^{1,3} 戴廷恩²

1. 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所植物病理系
 2. 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所園藝系
 3. 聯絡作者：電子郵件cachang@ms1.hinet.net；傳真04-3331089
- 接受日期：中華民國 88 年 9 月 30 日

陳金枝、張清安、戴廷恩. 1999. 菜豆黃化嵌紋病毒及胡瓜嵌紋病毒在唐菖蒲葉片之分佈及其對病毒檢測之影響. 植病會刊8:117-120.

唐菖蒲 (*Gladioli hybridus* Hort.) 俗稱劍蘭或福蘭，為原產於南非及地中海之鳶尾科植物⁽⁵⁾，可做為庭園作物或大規模切花生產，在本省其栽培面積與每年之外銷切花數量均僅次於菊花，被視為極具發展潛力之球根花卉⁽⁵⁾。近年來本省農民所種植之唐菖蒲種球，除少數由農民自行留種外，大多以荷蘭進口者為主。唐菖蒲生長期間若感染病毒，會導致切花品質低落而影響市場價值^(2,9)。根據國內外文獻之記載，可感染唐菖蒲之病毒共有 12 種之多^(1,2,9)，但多數病毒均屬偶然侵染，並未造成經濟性危害，只有菜豆黃化嵌紋病毒 (bean yellow mosaic potyvirus, BYMV) 及胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic cucumovirus, CMV) 二者被認為發生最普遍，且對切花之生產最具威脅^(2,9)。

有關BYMV及CMV在唐菖蒲上之發生情形及其檢定技術之開發，在前人之研究中已見諸許多報告^(1,8,9,10,11)。一般而言，BYMV單獨感染唐菖蒲時，植株葉片常出現極輕微之嵌紋或斑紋病徵，有些品種甚至根本不出現可辨識之徵狀^(1,2,9)；因此多數學者認為感染BYMV並不會對唐菖蒲造成明顯之影響，而長久以來世界主要生產唐菖蒲之國家、地區或廠商也從未將BYMV列入例行檢查之對象⁽⁹⁾，導致部份資料顯示現有之商業品種與個體幾乎已百分之百帶有BYMV病毒⁽⁹⁾。但已感染BYMV之植株若重複感染CMV時，罹病株葉片容易出現嚴重之嵌紋、褪色條紋，甚至部份品種會出現白化條斑病徵^(2,9)，有些敏感性品種甚至花部也會出現褪色或深色條紋、花形不整及提早凋謝等病徵^(2,9)。因此各唐菖蒲種球主要生產國家通常將CMV列為特定檢查對象，在開花球生產過程中嚴格監控，以避免其過度蔓延而危及切花生產品質^(2,9)。尤其每一個商業品種在種球量產前，其原種種球通常必須經過免疫抗體檢查程序，確定免於CMV感染之後，才能進入後續之開花球大量生產，因此CMV之檢定一向被視為唐菖蒲種球生產過程中必要之程序。近年來唐菖蒲之雜交育種蓬勃發展，新的品系不斷被育出，經過選種程序，目前許

多商業品系對CMV已具有某種程度之耐性（未發表資料），感染後之病徵較為輕微，因此這些品種在最後階段之開花球繁殖過程中縱使感染CMV，也不易被工作人員透過病徵選別加以淘汰，此種現象是導致現有之商業品系感染CMV之比率偏高之原因，雖然這些品系本身具有耐病性而病徵輕微，對切花之生產影響不大，但是對於繁殖開花球之業者而言，部份品系若感染比率偏高形成病毒根源，也會對其他敏感品系造成威脅，此種現象更加凸顯CMV之檢定在唐菖蒲優質種球生產體系中之重要性^(2,9)。

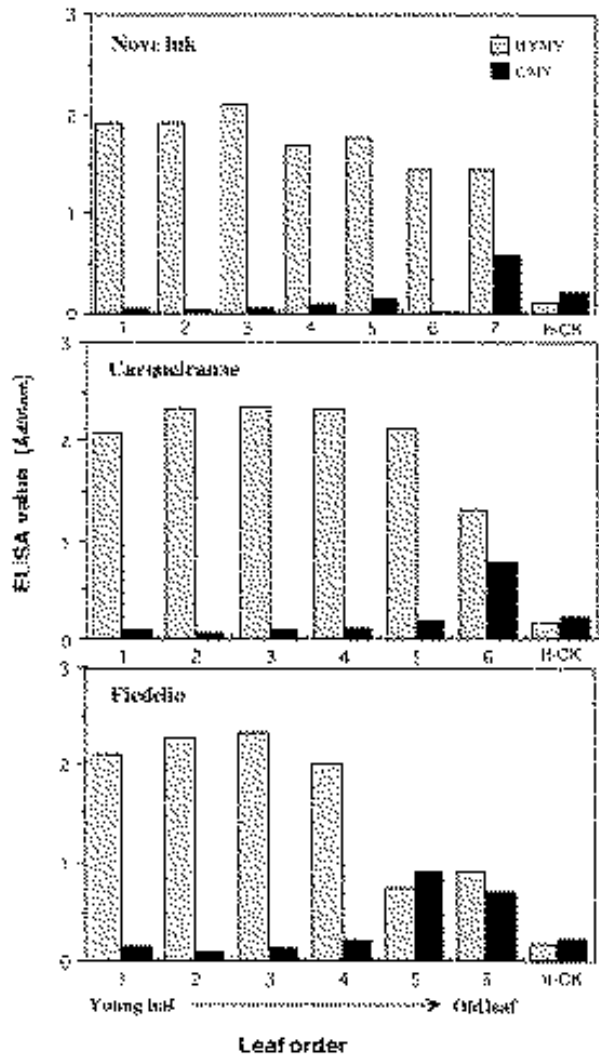
根據Stein等人之報告，BYMV及CMV均可由感染植株之葉片中被檢測出來，但CMV由球根組織中被檢出之機率高於葉片^(10,11)。近年來本研究室針對病毒在部份花卉作物上之分佈及其對檢測結果之影響研究中，亦發現雖然理論上病毒應造成系統性感染，但多項證據顯示植株不同部位組織內之病毒濃度並不相同^(3,4)，且不同病毒種類有不同之分佈特性，有些病毒甚至只累積於某些特定部位，而其他部位則濃度偏低，此種情形導致檢查時必須正確取樣，才能獲得正確之檢定結果^(3,4)。以百合為例，本研究室過去之研究發現CMV在植株上之分佈相當不均勻，檢測時必須採取莖部之表皮組織才能獲得較高之檢出率⁽³⁾。至於BYMV和CMV二者在唐菖蒲植株上之分佈情形，是否會因取樣部位不同而影響檢測結果，並未見有相關之報告可供參考。本研究之目的即在於探討BYMV及CMV二者於唐菖蒲植株不同葉序上分佈之差異，以找出檢定田間植株時之最佳取樣部位，作為未來進行例行病毒檢測之依據，以提高檢定之準確性。

為比較BYMV及CMV在唐菖蒲植株不同葉位組織中濃度分佈之差異性，選取田間栽培之唐菖蒲，於植株6~7片葉期，依葉序由上而下每一葉片分別切取0.1 g組織，以3 ml之15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 加以研磨，所得粗汁液直接添加於96孔EIA反應盤內 (100 ul/孔)，再以本研究室過去所製備稀釋 1000倍之BYMV與CMV之免疫球蛋白 (IgG) 進行Indirect ELISA檢

測，所採用之流程已於過去之報告中詳述^(1, 6)，反應結果以EIA讀值儀 (E-Max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 於添加鹼性磷酸酶基質後30分鐘，讀取波長405 nm下之吸收值，作為評估病毒濃度高低之依據。本試驗共檢測 Nova luk、Carqueiranne及Fidelio等三個唐菖蒲品系，每一品系選取 10株經初步檢測確定感染 BYMV與CMV之植株，再以ELISA逐葉進行病毒檢測，求取各葉序組織之EIA平均值，代表該葉序之病毒濃度。檢測結果發現BYMV於唐菖蒲全株不同葉位之葉片組織均可被檢出，且各葉位組織之EIA反應值均達0.8以上，遠高於正負反應之臨界值 (健康對照唐菖蒲所測得EIA值之二倍值)，而上位葉之病毒濃度則明顯高於下位葉 (圖一)。CMV之濃度分佈型式則與BYMV者相反，下位老葉組織內之病毒濃度明顯高於上位新葉，在Nova luk及Carqueiranne品系上僅能在底層老葉組織才能測出 CMV之存在，而其新葉組織中則未有任何CMV之抗原性反應 (圖一)。

前述之試驗結果顯示，感染 CMV之唐菖蒲有累積病毒於下位葉組織之傾向，此現象會導致若依一般慣例採取新葉組織作為檢定材料時，會獲得與事實相左之結果。為進一步確定此現象之真實性，進一步選用 Wig's Sensation、Carqueiranne、Cartago、Fidelio、Nova Lux、Amsterdam等六個唐菖蒲品系，每一品系逢機選取 20棵植株，採取每一植株之最上位新葉及最下位老葉之組織進行ELISA檢定，結果與前項實驗相同，不管採取新葉或老葉為材料，BYMV均可被順利檢測出來 (表一)。由不同唐菖蒲品系之新葉組織所測得BYMV之EIA反應值介於 1.19 ~ 2.37間，而由老葉組織所測得之EIA反應值則為0.33 ~ 1.32間，此結果再次印證BYMV在唐菖蒲新葉組織之分佈濃度較下位老葉組織高。但不論選取老葉或新葉，其BYMV之濃度均高於ELISA檢定結果被判定為有病毒感染之臨界值，因此不會影響檢定結果之正確性。另外採取不同唐菖蒲品系之新葉組織所測得之CMV感染比率介於0 ~ 60%，其EIA反應值介於0 ~ 0.71；若採取下位老葉組織所測得之感染比率則達到10 ~ 100%，EIA反應值為0.26 ~ 1.34。由此結果顯示，不管任何唐菖蒲品系，其老葉樣品所得之CMV檢測率或EIA反應值均較高 (表一)。在六個供試品系中有三個其新葉組織內根本無法測得 CMV之抗原性反應，而唯有在下位老葉組織中方能檢測出來。

由於上述之試驗中，部分唐菖蒲品系只有在下位老葉組織中才顯現CMV之抗原性反應，但檢視其EIA反應值除 Nova Lux高於1.0外，其餘五個供試品系均偏低，有些品系如 Amsterdam與Carqueiranne之EIA反應值甚至接近於判斷正負反應之臨界值 (表一)，為避免此種結果是因抗血清與健康植物成分間之交叉反應，所引起之假性正反應 (false positive reaction)，而非真正由於CMV感染所造成，本研究進一步將測得具有CMV抗原性反應之老葉材料，分別進行接種試驗及免疫擴散反應⁽⁶⁾。結果發現將這些材料接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片，經2 ~ 3



圖一、比較菜豆黃化嵌紋病毒 (BYMV) 及胡瓜嵌紋病毒 (CMV) 在唐菖蒲植株不同葉序組織中濃度之差異。選取三種栽培於田間之唐菖蒲品系 (Nova luk、Carqueiranne及 Fidelio)，於植株 6 ~ 7 片葉期，依葉序由上而下每一葉片分別切取 0.1 g 組織，以 3 ml 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 加以研磨，所得汁液以 BYMV 與 CMV 之抗體進行 Indirect ELISA 反應。圖中所示結果乃每一品系檢測 10 棵植株之不同葉位組織所測得之 EIA 平均值，反應值乃加入鹼性磷酸酶基質 30 分鐘後於 405 nm 下所測得之吸光度。H-CK 乃經事先檢測確定未感染 BYMV 及 CMV 之同品系植株葉片組織之 EIA 平均值。
Fig. 1. Comparison of the concentration of bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) and cucumber mosaic cucumovirus (CMV) in leaf tissues of different leaf orders of gladiolus plants. Ten plants in 6-7 leaf stage were collected from each gladiolus varieties grown the field for this experiment. Aliquots of 0.1g leaf tissue from each leaf order was sampled, ground in 3 ml of sodium carbonate buffer (pH 7.5) and determined by indirect ELISA for the relative virus concentrations. The data shown in the figure are the averages of absorbance values at 405 nm taken 30 min after the addition of enzyme substrate. H-CK represents the EIA value obtained from the leaf tissue of healthy uninfected plant which has been determined previously by ELISA.

表一、由六種不同唐菖蒲品系之新葉和老葉組織檢測菜豆黃化嵌紋病毒 (BYMV)及胡瓜嵌紋病毒(CMV)之感染比率與EIA反應值

Table 1. Detection rates of bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) and cucumber mosaic cucumovirus (CMV) and their EIA readings obtained from ELISA indexing of youngest new leaves and lowest old ones of six different gladiolus varieties.

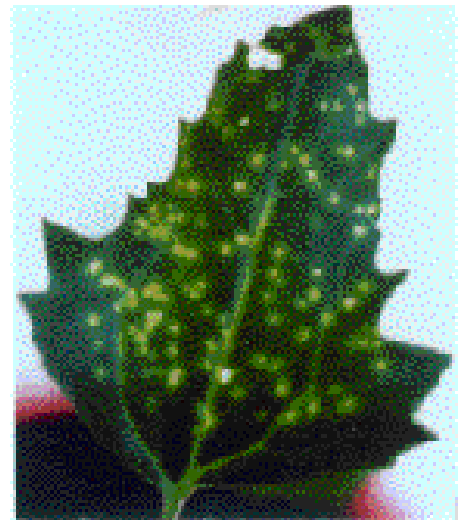
Gladiolus varieties	% of detection ¹ and EIA readings (in parenthesis) ²							
	BYMV				CMV			
	Youngest leaf		Oldest leaf		Youngest leaf		Oldest leaf	
Wig's Sensation	100 ¹	(1.33) ²	100	(0.52)	5	(0.24)	25	(0.30)
Carqueiranne	100	(2.37)	100	(0.59)	0	(ND) ³	21	(0.26)
Cartago	100	(1.63)	100	(0.33)	20	(0.37)	45	(0.37)
Fidelio	100	(1.19)	100	(1.07)	60	(0.71)	75	(0.84)
Nova Lux	100	(1.19)	100	(0.61)	0	(ND)	100	(1.34)
Amsterdam	100	(2.35)	100	(1.32)	0	(ND)	10	(0.29)

¹. % of detection = (No. of samples with positive reaction divided by 20, the total no. sampled from each varieties) x 100 %.

². EIA readings shown in the parenthesis are the absorbance value at 405 nm taken 30 min after the addition of enzyme substrate solution. Figures are the averages of EIA readings only from those samples with positive reactions (EIA readings exceed two times of healthy control readings).

³. ND indicates none of the sample tested are ELISA positive.

天後即出現局部斑點 (圖二), 此一快速表現局部病斑之反應符合CMV之特性, 經三次單斑接種篩選後取之與CMV抗血清進行免疫擴散反應, 發現奎藜材料與對照CMV抗原的確具有同源反應 (identical reaction) (圖三)。證實由唐菖蒲老葉組織接種繁殖所得之奎藜斑點確實為CMV感染所造成, 此等結果亦進一步證明本研究以ELISA檢測出唐菖蒲老葉上具有CMV反應之正確性。綜合上述結果顯示, 在唐菖蒲植株上BYMV之分佈較均勻, 但其濃度在不同葉序上仍有差異, 於上位葉之濃度較下位葉者高; 而CMV則分布不均, 多集中於下位老葉上。因此BYMV和CMV在唐菖蒲葉片上之分佈差異相當大, 於田間取樣檢測病毒時, 應針對檢測之對象病毒進行適當之採樣, 以獲得最正確之結果。倘若需要同時檢測BYMV及CMV, 則建議混合部分上位新葉與下位老葉後進行檢測, 如此當可增加檢定結果之準確性。



圖二、將檢測出具有胡瓜嵌紋病毒 (CMV) 抗原性反應之唐菖蒲老葉組織接種於奎藜葉片所出現之局部性斑點。

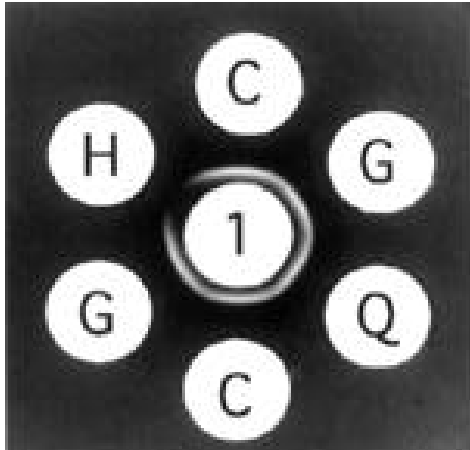
Fig. 2. Photograph showing the local lesions on the leaf of *Chenopodium quinoa* developed by the inoculation of gladiolus lowest old leaves with ELISA-positive reaction of cucumber mosaic cucumovirus.

謝 辭

本研究承台灣省農林廳球根「花卉病毒研究及種球快速繁殖用檢測技術發展」計畫經費補助, 僅此致謝。試驗期間承實驗室謝孟娟、謝孟純小姐諸多協助得以完成, 僅此致以由衷謝意。

引用文獻

- 許秀惠、黃秋雄、張清安. 1987. 感染唐菖蒲之菜豆黃化嵌紋病毒之鑑定、純化及血清學研究。中華農業研究36(1):94-104。
- 張清安. 1994. 台灣花卉病毒病害。p. 213-224. 台灣花卉病蟲害研討會專刊。中華植物保護學會特刊新二
- 號。277 pp。
- 張清安、陳金枝、鄧汀欽、蔡惠婷. 1996. 百合斑紋、百合隱微型及胡瓜嵌紋等三種病毒於百合植株上分佈之差異及三者對不同病徵型表現之影響。植保會刊38:372。
- 陳金枝、江芬蘭、張清安. 1998. 夜來香微嵌紋病毒在植株內之分布及其對病毒檢測之影響。植保會刊40:199-207。
- 戴廷恩. 1996. 唐菖蒲栽培與品種選育。p. 50-57. 球根花卉產業研討會專刊。農林廳種苗改良繁殖場編印。



圖三、檢測出具有胡瓜嵌紋病毒 (CMV) 抗原性反應之唐菖蒲老葉組織及其接種於奎藜上所產生之局部病斑材料與 CMV 抗血清進行 SDS-免疫擴散試驗產生同源性反應之結果。中央小穴乃添加 CMV 抗血清 (1), 周圍六穴乃分別加入經 SDS 處理後之 CMV 標準抗原 (C), 唐菖蒲老葉組織 (G), 奎藜之局部病斑材料 (Q) 及健全奎藜對照抗原 (H)。
Fig. 3. Photograph showing the serological identical reaction between antigens from the gladiolus lowest old leaves and local lesions from *Chenopodium quinoa* with the antiserum against cucumber mosaic cucumovirus (CMV) in SDS-immunodiffusion test. Healthy *C. quinoa* (H), standard CMV antigen (C), gladiolus old leaves (G), local lesions of *C. quinoa* (Q) were used as antigens to react with undiluted antiserum against CMV (1).

ABSTRACT

Chen, C. C.¹, Chang, C. A.^{1,3}, and Dai, T.² 1999. Variable distribution patterns of bean yellow mosaic potyvirus and cucumber mosaic cucumoviruses in gladiolus plant and their influence on virus detection. *Plant Pathol. Bull.* 8:117-120. (¹ Department of Plant Pathology and ² Horticulture, Taiwan Agricultural Research Institute, Wu-Feng, Taichung 413, Taiwan, R. O. C., ³ Corresponding author: E-mail: cachang@ms1.hinet.net; Fax: 04-3331089)

The concentrations of bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) and cucumber mosaic cucumoviruses (CMV) accumulated in leaf tissues of different leaf orders of gladiolus plant were compared by ELISA in this study. The result showed that the distribution patterns of these two viruses in gladiolus plants were different. The former is evenly distributed in tissues throughout different leaf orders, although younger leaves tend to accumulate slightly higher concentrations than the older ones. On the contrary, CMV accumulates its concentration in the lower old leaves, therefore higher detection rates and EIA readings are always obtained from this leaf position. Furthermore, we have found that infection of CMV in some of the gladiolus varieties can only be detected by indexing the lowest old leaf but not the younger ones. This particular distribution pattern of CMV in gladiolus plants was further confirmed by inoculating the ELISA positive old leaf tissue on *Chenopodium quinoa* to develop local lesions, which were subsequently shown to react indistinguishably with standard CMV antigens in SDS-immunodiffusion test. Based on these results, it is proposed that indexing of BYMV and CMV infections in gladiolus plants should be conducted by sampling the lowest old leaf or mixing it with the youngest new leaf in order to obtain optimum results.

Key words: gladiolus, BYMV, CMV, virus indexing, ELISA.

280 pp.

6. Chang, C. A., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. 1988. Characterization and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyviruses. *Phytopathology* 78:1266-1275.
7. Purcifull, D. E., and Batchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. *Fla. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 788. 39 pp.
8. Rosner A, Stein A, Levy S, Lilien-Kipnis H. 1994. Evaluation of linked PCR- transcription amplification procedure for bean yellow mosaic virus detection in gladioli. *J. Virol Methods* 47(1-2):227-35.
9. Stein, A. 1995. Gladiolus. p. 281-292. In: *Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops*. Loebenstein et al. (eds.), John Wiley & Sons, West Sussex, United Kingdom, 543 pp.
10. Stein, A., Loebenstein, G., and Koenig, R. 1979. Detection of cucumber mosaic virus and bean yellow mosaic virus in gladioli by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Pl. Dis. Repr.* 63:185-188.
11. Stein, A., Levy, S., and Loebenstein, G. 1988. Detection of virus in gladioli corms. *Acta. Horti.* 234:275-280.