

利用光學顯微鏡 電子顯微鏡及血清學技術診斷洋桔梗壞疽病毒

陳慶忠^{1,3}、曹淑麗¹、徐惠迪²

1 彰化縣大村鄉 行政院農業委員會台中區農業改良場

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

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

接受日期：民國 90 年 7 月 10 日

摘要

陳慶忠、曹淑麗、徐惠迪。2001。利用光學顯微鏡、電子顯微鏡及血清學技術診斷洋桔梗壞疽病毒。植病會刊 10:105-114。

洋桔梗壞疽病毒 (*Lisianthus necrosis virus*, LNV) 為晚近在中部地區洋桔梗上新發現及鑑定之球形病毒。本試驗利用光學顯微鏡、電子顯微鏡及三種血清學技術，探討以其偵測及診斷 LNV 之可行性。利用橙綠蛋白質染劑 (Calcomine orange-Luxol brilliant green BL) 染色罹病洋桔梗葉片表皮，以光學顯微鏡可觀察到細胞質內含有不規則束狀類似內含體之構造。醋酸鈾 (uranyl acetate) 溶液陰染罹病葉片粗汁液或純化懸浮液於電子顯微鏡下，可觀察到直徑約 32nm 之球形病毒；超薄切片罹病葉片及花瓣於細胞質內可觀察到類似之病毒顆粒或病毒聚集之情形。以 LNV 兔子抗血清及老鼠單元抗體進行西方轉漬反應 (Western blot) 可偵測到單一鞘蛋白基本單位 (coat protein subunit)，分子量約為 38 kDa。相同之抗血清進行間接酵素連結免疫分析 (indirect ELISA) 或三層酵素連結免疫分析 (TAS ELISA)，LNV 罹病植物組織粗汁液全抗原之最終稀釋倍數為 10^{-4} 或 10^{-5} 。於 26℃，LNV 罹病葉粗汁液機械接種於洋桔梗幼苗，以直接組織轉漬法 (direct tissue blot, DTB) 於接種後 12 小時即能偵測到新複製之 LNV 抗原，而 indirect ELISA 則於接種後 48 小時始能偵測之，顯然以 DTB 偵測新複製之 LNV 抗原的時間較 indirect ELISA 為早。

關鍵詞：洋桔梗壞疽病毒、診斷方法

緒言

1995 年 3 月彰化縣永靖鄉一塑膠布溫室栽培之洋桔梗 (*Eustoma rusellianum* (Don.) Grieseb) 植株嚴重發生異常現象，主要徵狀為葉片產生許多黃化斑點，逐漸轉變成壞疽性斑點或多環輪斑，有時許多斑點融合成較大之斑塊而致全葉萎凋，類似之徵狀偶而也在葉柄或枝梗觀察到。罹病植株明顯矮化、葉片變小、開花受到抑制或花朵呈畸形，花瓣產生明顯之白痕。Chen *et al.* (2000)⁽⁵⁾ 分離及純化該病原得到一種直徑約 32 nm 之球形病毒，並就病毒之生物性、理化性加予探討及血清學特性分析結果，證實其為洋桔梗壞疽病毒 (*Lisianthus necrosis necrovirus*, LNV) 之一系統 (strain)。LNV 最早在日本埼玉縣發生^(15,16)。在台灣分離之病毒系統其寄主範圍較之日本者廣⁽⁵⁾。由於當時永靖鄉僅此一農戶種植之洋桔梗發生此種病害，且使用之種苗係由丹麥進口，因此質疑該新病毒是隨進口種苗而侵入。Iwaki *et al.*⁽¹⁵⁾ 的報告指出 LNV 經 *Olpidium* sp. 媒介傳播，Chen *et al.* (2000)⁽⁵⁾ 於發病圃採集病土盆栽種植健康洋桔

梗幼苗能導致植株發病，惟未能成功自土壤中分離 *Olpidium* sp。

有鑑於國內花卉業者不斷引進新興花卉，種苗及種球的引進極可能伴隨引進病毒，這些引進之病毒極有可能在栽培地區立足蔓延而威脅國內花卉產業或其他農作物生產。在新興花卉引進栽培不能避免的趨勢下，發展可能被引進病毒之偵測技術成為阻嚇新病毒侵入之利器。本文就洋桔梗上新分離之 LNV 的偵測技術包括光學顯微鏡、電子顯微鏡觀察及血清學偵測方法試驗所得結果提出報告，以期提供病毒診斷及偵測之應用。

材料與方法

病毒分離及保存

1995 年 3 月在彰化縣永靖鄉江姓花農洋桔梗園採集產生黃化斑點之葉片，以 2 倍量 (W/V) 磷酸緩衝液 (pH7.0,

內含 0.01 M Na₂SO₃) 磨碎，以棉花棒沾病葉粗汁液摩擦接種於撒有 400 目金鋼砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa*)，約二日後產生壞疽斑點，經三次單斑分離之病毒再接種到奎藜或洋桔梗，發病材料供為病毒保存源及純化材料。

病毒純化

以機械接種約 2 天發病之奎藜新鮮葉片做為純化材料。純化工作依 Iwaki *et al.* 之方法⁽¹⁵⁾ 略加修改進行。罹病奎藜葉片以緩衝液 (0.5 M potassium phosphate buffer, pH 7.5, 內含 1% 2-mercaptoethanol) 萃取，濾液以氯仿 (chloroform) 及四氯化碳 (CCl₄) 淨化，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 5 ml 之 20% (W/V) 蔗糖溶液墊層上離心。所得懸浮液置於 10-40% 蔗糖密度梯度離心 (Hitachi RPS 40T, 25,000 rpm, 3 小時)，吸起反光帶、高速離心、沈降後懸浮之，即得純化病毒。

光學顯微鏡觀察

依據 Christie and Edwardson (1977)⁽⁷⁾ 之 Calcomine orange-Luxol brilliant green 染色法觀察內含體。撕取洋桔梗罹病葉片表皮並以 5% Triton X-100 處理 5 分鐘。再以 1% Calcomine orange -1% Luxol brilliant green 染液 (V/V = 9: 1) 染色 10 分鐘後吸除殘餘染液，在 95% 酒精中脫色 10-20 秒，放入 2-甲氧基乙基醋酸 (2-methoxyethylacetate) 中 10-15 分鐘，於載玻片上封片，再行光學顯微鏡檢，並以健康植株做為對照。

電子顯微鏡觀察

陰染法：機械接種 LNV 發病之洋桔梗或奎藜葉片組織粗汁液與 0.1% bacitracin (1: 1) 混合，依 Christie *et al.* (1987) 方法⁽⁸⁾ 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，依前述方法染色並以電子顯微鏡 (JEM-200CX, JEOL) 觀察病毒顆粒之形態。

超薄切片法：經機械接種之洋桔梗罹病葉片及花器等組織，分別以 2% 戊二醛 (glutaraldehyde) 及 1% 四氧化鉻 (osmium tetroxide) 做前、後固定，再以酒精系列脫水和 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% 醋酸鈾溶液染色後以電子顯微鏡觀察罹病組織之病變情形。

抗體

試驗使用之抗體包括 LNV 老鼠單元抗體細胞培養液 (7ES-3G-10) 由國立中興大學植病系陳煜焜老師製備供用；LNV 日本分離株兔子抗血清由 Dr. Iwaki⁽¹⁵⁾ 贈用；LNV 台灣分離株兔子抗血清由本實驗室製備，製備時將

純化之病毒經電泳分離⁽¹¹⁾，析取 38 kDa 病毒鞘蛋白做為抗原，每週一次，經連續四次肌肉注射紐西蘭白兔，第五週起進行耳朵靜脈採血，所得抗血清，保存於 -40 備用。本試驗僅於初期鑑定病毒種類時使用日本分離株兔子抗血清，其餘相關之血清學試驗均使用 LNV 台灣分離株兔子抗血清 (除有說明需要，以下均簡稱兔子抗血清) 或老鼠單元抗體細胞培養液 (除有說明需要，以下均簡稱老鼠單元抗體)。

酵素連結免疫分析

間接酵素連結免疫分析 (indirect ELISA) 係依 Koenig (1981)⁽¹⁷⁾ 之方法進行。供試植物葉片以 9 倍量 (W/V) 之塗覆緩衝液 (coating buffer, 1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃, 1000 ml H₂O, pH 9.6) 研磨，取 200 μl 置入微量盤之孔穴中，於 37 靜置 2.5 小時後用 PBST (8 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 2.9 g Na₂HPO₄, 7H₂O, 0.2 g KCl, 0.2g NaN₃, 0.5 ml Tween-20, 1000 ml H₂O, pH 7.4) 清洗 3 次。加入以結合緩衝液 (conjugate buffer, 2% PVP-40, 0.2% ovalbumin, 1000 ml PBST) 稀釋 1000 倍之 LNV 兔子抗血清或稀釋 8 倍之細胞培養液老鼠單元抗體，於 37 靜置 2 小時，用 PBST 清洗 3 次，再加入以結合緩衝液稀釋 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)，老鼠單元抗體則加入 1000 倍之山羊抗老鼠免疫球蛋白 (goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate, Jackson)。三層酵素連結免疫分析 (triple-antibody sandwich ELISA, TAS-ELISA) 係依據 Hsu and Lawson⁽¹³⁾ 之方法進行，依序加入 LNV 兔子抗血清球蛋白 (1: 2000)、3% bovine serum albumin (BSA)、抗原、LNV 老鼠單元抗體細胞培養液 (1: 8)，最後加入以 conjugate buffer 稀釋 1000 倍之 goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate, Jackson。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 μl 以 substrate buffer (97 ml diethanolamine, 800 ml H₂O, 0.16 g NaN₃, pH9.8) 配製之酵素基質 (p-nitrophenyl phosphate, disodium, Sigma, 1 mg/ml) 試液反應 20-60 分鐘，每穴再加入 50 μl 之 3 M 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。健康對照 A405 之讀值的 3 倍為正反應之判定依據。

組織轉漬法

直接組織轉漬法 (direct tissue blotting, DTB) 依 Lin *et al.* (1990)⁽¹⁸⁾ 及 Hsu and Lawson (1991)⁽¹⁴⁾ 之方法進行。將接種 LNV 發病之洋桔梗葉片撕起表皮或取其根、莖部位，適力壓漬於亞硝基樹脂膜 (nitrocellulose membrane, nitroscreen, DuPont)，隨後浸於內含 2% BSA 與 1% Triton

X-100 之 PBS，室溫振盪 60 分鐘後，浸於以 PBS 稀釋之 LNV 兔子抗血清 (1:1000) 或老鼠單元抗體細胞培養液 (1:8) 於室溫放置 2 小時或於 4 過夜。連續三次以 PBST 溶液清洗 (PBS 內含 0.05% Tween 20)，每次 10-15 分鐘。亞硝基樹脂膜隨之即浸於以結合緩衝液稀釋 5000 倍之 goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Jackson 於室溫放置 2 小時，以 PBST 連續清洗三次，每次 10-15 分鐘，再行顯色。

西方轉漬法

西方轉漬法 (Western blot) 分析時係將 LNV 罹病組織萃取粗汁液 (粗汁液先經 1,000 rpm 離心 10 分鐘) 或純化病毒懸浮液以解離緩衝液 (degrading buffer) 處理並於沸水煮 2 分鐘後經 SDS-PAGE 電泳分離後，根據 Gooderham (1984)⁽¹²⁾ 之方法以蛋白轉印槽 (Bio-Rad transblot apparatus) 將電泳膠上之蛋白轉印到轉漬膜 (PVDF membrane, Millipore) 上，PVDF 轉漬膜經浸於轉印緩衝液 (transfer buffer) 清洗後，再以對應兔子抗血清稀釋液 (1:1000) 或 LNV 老鼠單元抗體細胞培養液 (1:8) 浸漬，PVDF 膜以 TSW 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.9% NaCl, 0.25% gelatin, 0.1% Triton X-100, 0.02% SDS) 清洗後浸泡於 goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Jackson (1:5000)，PVDF 膜再以 TSW 緩衝液清洗，最後行呈色反應。

病毒之接種及偵測

LNV 罹病洋桔梗葉片粗汁液以金鋼砂機械接種於 5-6 葉期洋桔梗幼苗展開葉往下算第二對稱葉即接種二葉片，接種株置於 21 及 26 (恆溫)，並於接種後第一天 (24 小時)、第二天 (48 小時) 及第三天 (72 小時) 分別採取接種葉片、根及莖，以 LNV 兔子抗血清利用 indirect ELISA 及 DTB 進行分析比較其偵測效力。試驗重覆三次，每次每一處理接種六株植齡相仿之植株，每日取樣二株，其中之二接種葉片 (每株一葉片) 供 indirect ELISA 分析，另二葉片供為 DTB 分析。另以蒸餾水接種三株做為對照處理。

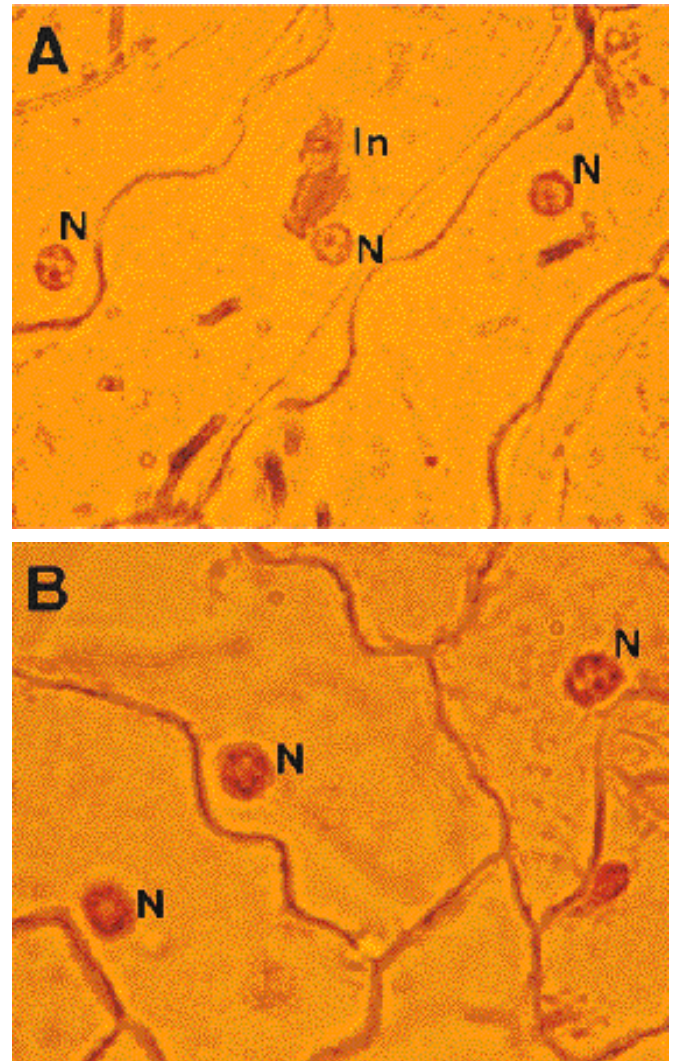
結 果

光學顯微鏡觀察

利用橙綠蛋白質染劑 Calcomine orange-Luxol brilliant green BL) 染色感染 LNV 的洋桔梗葉片表皮細胞，以光學顯微鏡檢可於細胞質內細胞核附近觀察到一種呈不規則鬆散狀之類似內含體構造，健康對照則無 (圖一)。

電子顯微鏡觀察

純化之病毒以 2% 醋酸鉍染色於電子顯微鏡下可觀察到直徑約 32 nm 之球形病毒顆粒 (圖二 A)。超薄切片罹病



圖一、感染洋桔梗壞疽病毒之洋桔梗表皮以橙綠蛋白質染劑染色光學顯微鏡觀察。罹病葉片表皮層 (A) 及健康 (B) 橙綠蛋白質染劑染色，並以 2-甲氧基乙基醋酸褪色後於光學顯微鏡檢可觀察到類似內含體之構造 (In) 及細胞核 (N)。

Fig. 1. Light microscopy of cytoplasmic inclusion-like structures in epidermal cells of *Eustoma russellianum* infected with *Lisianthus necrosis virus*. Epidermal layers of infected (A) and healthy leaves (B) were stained with Calcomine orange-Luxol brilliant green followed by destaining in 2-methoxyethyl acetate, mounting on a slide with euparal, and examination under a Leitz microscope. Inclusion body-like structures (In) and nucleus (N) are identified.

洋桔梗葉片柵狀組織之葉肉細胞原質體內可觀察到大量病毒顆粒聚集於基質內 (圖二 B)；葉肉細胞之細胞質內聚集病毒顆粒 (圖二 C)。罹病洋桔梗之花瓣內病毒顆粒分散於整個空胞中 (圖二 D)。此外，機械接種 LNV 發病之奎藜、煙草 (*Nicotiana benthamiana*)、絲瓜 (*Luffa cylindrica*) 等植物的葉肉細胞內亦都可觀察到病毒顆粒的分佈。

酵素聯結免疫反應

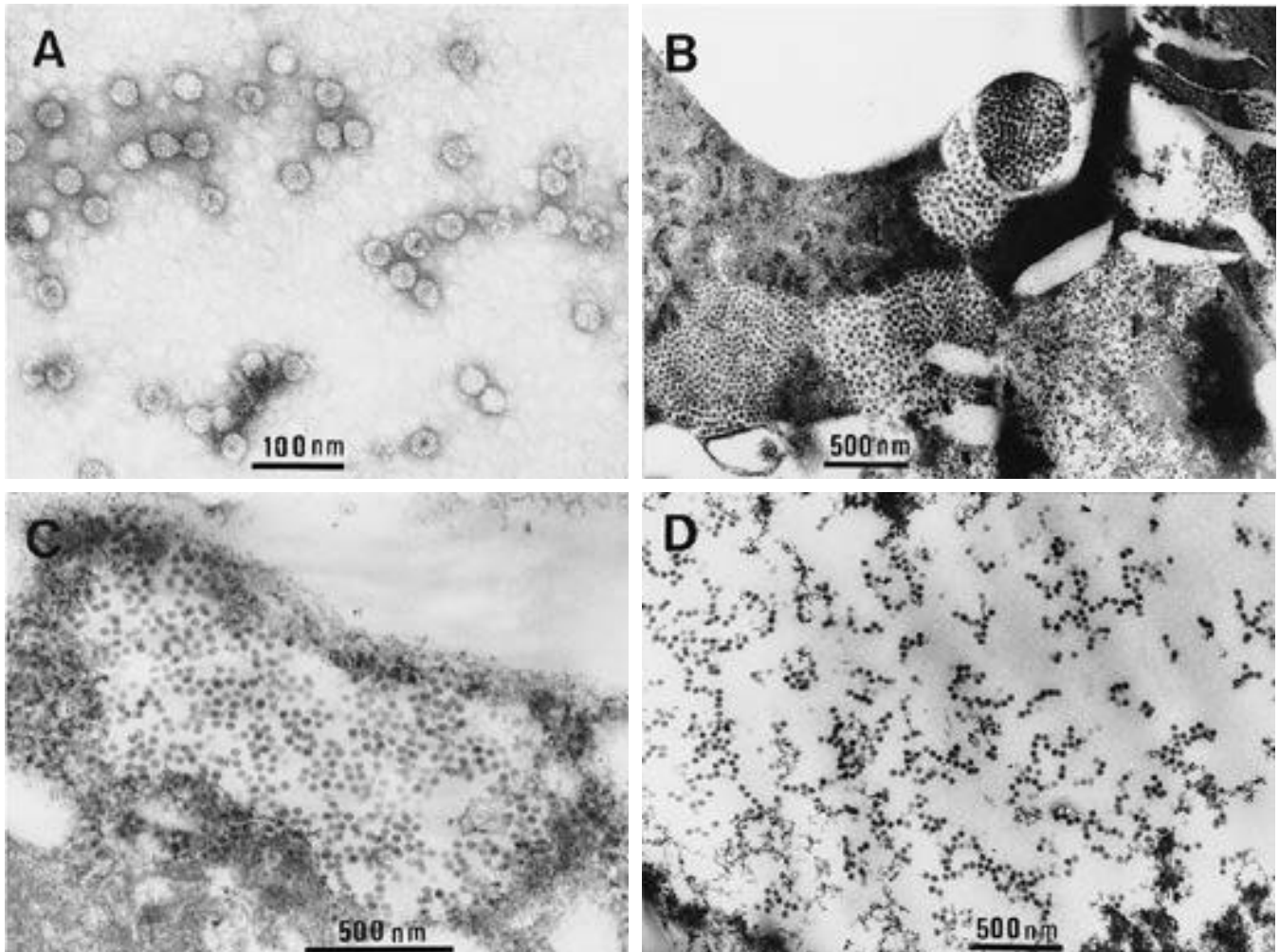
間接酵素聯結免疫分析法 (indirect ELISA) 以 LNV 台灣分離株兔子抗血清 (1:1000) 偵測同源抗原時，罹病洋桔梗葉片粗汁液全抗原稀釋至 10^{-6} ，罹病奎藜葉片粗汁液全抗原稀釋至 10^{-5} 均與抗體產生專一性反應 (圖三 A)。當使用 LNV 日本分離株兔子抗血清 (1:500) 時，罹病洋桔梗及奎藜葉片粗汁液全抗原分別稀釋至 10^{-5} 及 10^{-4} 仍與抗體產生專一性反應 (圖三 B)。以 LNV 老鼠單元抗體與罹病洋桔梗葉片及奎藜葉片粗汁液全抗原進行 TAS-ELISA 分析結果，二種粗汁液全抗原分別稀釋至 10^{-5} 及 10^{-4} 仍與抗體產生專一性反應 (圖三 C)；相同抗體以 indirect ELISA 分析結果罹病洋桔梗葉片及奎藜葉片粗汁液全抗原分別稀釋至 10^{-5} 及 10^{-4} 仍與抗體產生專一性反應 (圖三 D)。

直接組織轉漬法

直接組織轉漬法 (DTB) 以感染 LNV 之洋桔梗根、莖及葉擠壓在亞硝基樹脂膜，分別以 LNV 兔子抗血清及山羊抗白兔膽鹼酵素處理行顯色處理均呈紫色專一性反應，健康對照則無反應。相同之材料以 LNV 老鼠單元抗體及山羊抗老鼠膽鹼酵素處理後，行顯色處理亦均呈紫色專一性反應，健康對照亦無反應。

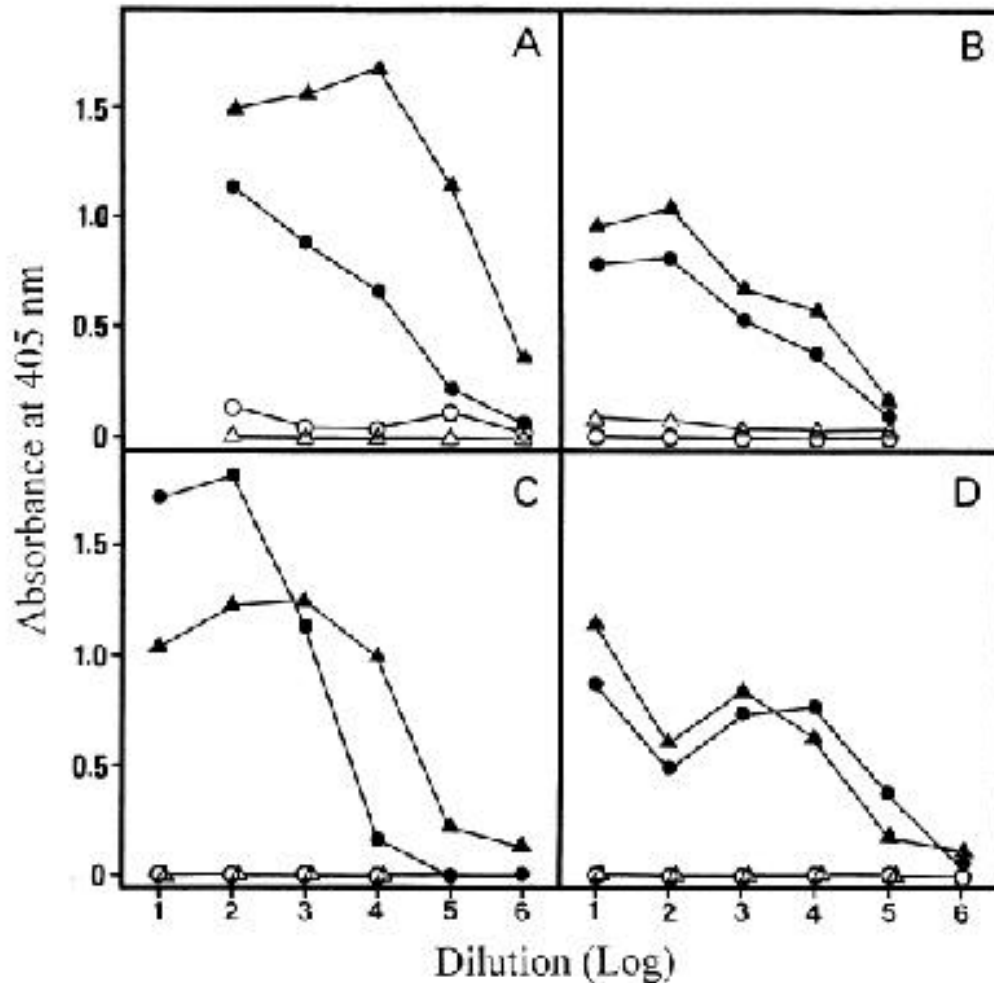
西方轉漬法

LNV 之純化病毒懸浮液及罹病葉粗汁液經 SDS-PAGE 電泳分離後，依西方轉漬法 (Western blot) 步驟，以 LNV 兔子抗血清及老鼠單元抗體處理結果，兩種抗體均



圖二、洋桔梗壞疽病毒之電子顯微鏡觀察。(A) 純化之病毒以醋酸鈾染色；(B) 超薄切片罹病洋桔梗葉片柵狀組織之葉肉細胞病毒顆粒集聚於原質體；(C) 超薄切片罹病洋桔梗葉片葉肉細胞細胞質內聚集病毒顆粒；(D) 超薄切片罹病洋桔梗之花瓣內病毒顆粒分佈於整個空胞中。

Fig. 2. Transmission electron microscopy of *Lisianthus necrosis virus* (LNV) (A) Uranium acetate-stained virions purified from LNV infected *Chenopodium quinoa*. (B) Ultra-thin section of parenchyma cell of infected lisianthus leaf containing virions in protoplast. (C) Ultra-thin section of mesophyll cell of infected lisianthus leaf showing virions aggregation in cytoplasm. (D) Distribution of virions in vacuole of petal of LNV infected lisianthus.



圖三、不同抗體以間接 (indirect ELISA) 或三層酵素聯結免疫分析法 (TAS-ELISA) 偵測洋桔梗壞疽病毒 (LNV) 之效力。Indirect ELISA (A, B, D) 及 TAS-ELISA (C) 偵測 LNV。LNV 台灣分離株兔子抗血清 (A)；LNV 日本分離株兔子抗血清 (B) 及細胞培養液老鼠單元抗體 (C, D)。罹病洋桔梗 () 及奎藜 () 之粗汁液為供試全抗原；健康洋桔梗 () 及奎藜 () 供為對照。Indirect ELISA (A, B, D) 將粗汁液全抗原加於微量盤孔穴，隨著加入兔子抗血清 (A, B) 或細胞培養液老鼠單元抗體 (D) 及鹼性磷酸酵素標示之山羊兔子免疫球蛋白 (A, B) 或鹼性磷酸酵素標示之山羊抗老鼠免疫球蛋白 (D)。TAS-ELISA (C) 將 LNV 兔子抗血清球蛋白加於微量盤孔穴，隨著加入抗原、細胞培養液老鼠單元抗體及鹼性磷酸酵素標示之山羊抗老鼠免疫球蛋白。

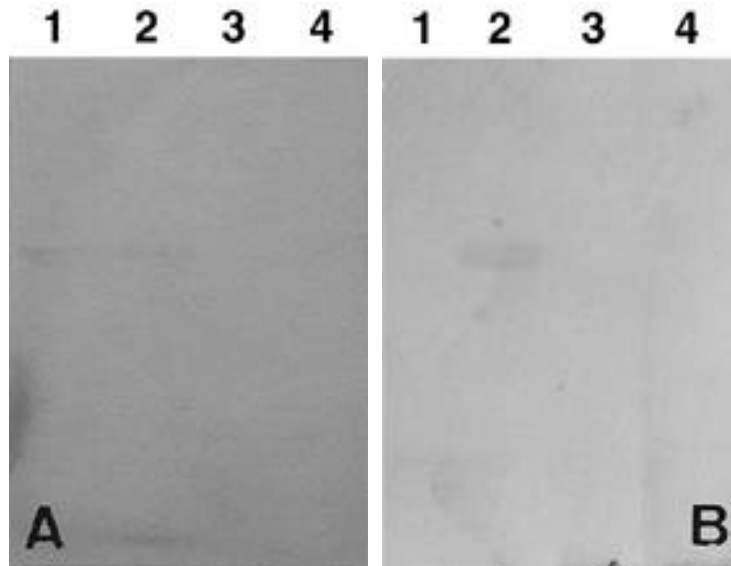
Fig. 3. Antigen-coated indirect ELISA (A, B, and D) and triple antibody sandwich ELISA (C) for detection of *Lisianthus necrosis virus*. Rabbit antiserum was prepared from a Japanese isolate of LNV (A). Both rabbit antiserum (B) and mouse monoclonal antibodies (C and D) were prepared from the Taiwan isolate of LNV in current studies. Health crude sap were used as controls (open triangles and open circles). In indirect ELISA (A, B, and D), antigen extracts were added to polystyrene ELISA plates followed by rabbit (A and B) or mouse monoclonal (D) antibodies and alkaline phosphatase-labeled goat anti-rabbit IgG (A and B) or goat anti-mouse IgG (D) conjugates, respectively. In TAS-ELISA (C), antigens were added to rabbit anti-LNV IgG-coated plates followed by mouse monoclonal antibodies and alkaline phosphatase-labeled goat anti-mouse IgG conjugates.

與純化病毒之鞘蛋白 (38kDa) 產生專一性反應。兔子抗血清與罹病葉粗汁液全抗原產生專一性反應與健康對照則無專一性反應產生；老鼠單元抗體與粗汁液全抗原及健康對照則均無產生專一性反應 (圖四)。

病毒之接種及偵測

在 21 時，接種葉於接種後第三天開始出現肉眼可辨識之極淡的灰白色圓斑病徵。以 indirect ELISA 分析接

種後第一、二天之葉片與兔子抗血清並無專一性反應產生，但與第三天之葉片則呈專一性反應；接種後第一、二及三天之根、莖與兔子抗血清均無專一性反應產生。以 DTB 偵測時，於接種後第一天的葉片在轉印於亞硝基樹脂膜呈色後出現少數幾點肉眼勉強可以辨識之針狀紫色斑點 (以下稱紫色斑點專一性反應)，第二及三天紫點變大 (圖五 A、B、C)。接種株的莖，第一天並無呈色反應，第二天部份樣本有紫色斑點專一性反應產生，亦即靠近接種



圖四、西方漬染法分析洋桔梗壞疽病毒鞘蛋白。(A)純化病毒(第1,2行);洋桔梗健康葉片粗汁液(第3行);罹病洋桔梗葉片粗汁液(第4行)。(B)罹病煙草葉片粗汁液(第1行);純化病毒(第2行);罹病洋桔梗葉片粗汁液(第3行);洋桔梗健康葉片粗汁液(第4行)。供試樣本於10%電泳膠片電泳後轉漬於PVDF膜,並以兔子抗血清(A)及細胞培養液老鼠單元抗體(B)處理之。

Fig. 4. Western blot analysis of coat proteins of *Lisianthus necrosis virus* (LNV) (A) purified virions (lane 1, 2); crude sap of health *lisianthus* (lane 3) and crude sap of LNV-infected *lisianthus* (lane 4) and (B) crude sap of LNV-infected *Nicotiana benthamiana* (lane 1); purified virions (lane 2); crude sap of LNV-infected *Lisianthus* (lane 3) and crude sap of health *lisianthus* (lane 4) were subjected to SDS-PAGE (10%), transferred to PVDF membrane and incubated with rabbit antiserum against LNV (A) and monoclonal antibody against LNV (B).

葉之往上一節的莖(以下稱第一莖節)及往下一節的莖(以下稱第二莖節)有紫色斑點專一性反應,但往下之第二、三節(以下稱第三、四莖節)則無反應;而另二次重覆試驗均僅於第二莖節有紫色斑點專一性反應產生,第三天四個莖節樣本均呈紫色斑點專一性反應;根部第一、二天並無專一性反應,第三天之樣本呈紫色斑點專一性反應。

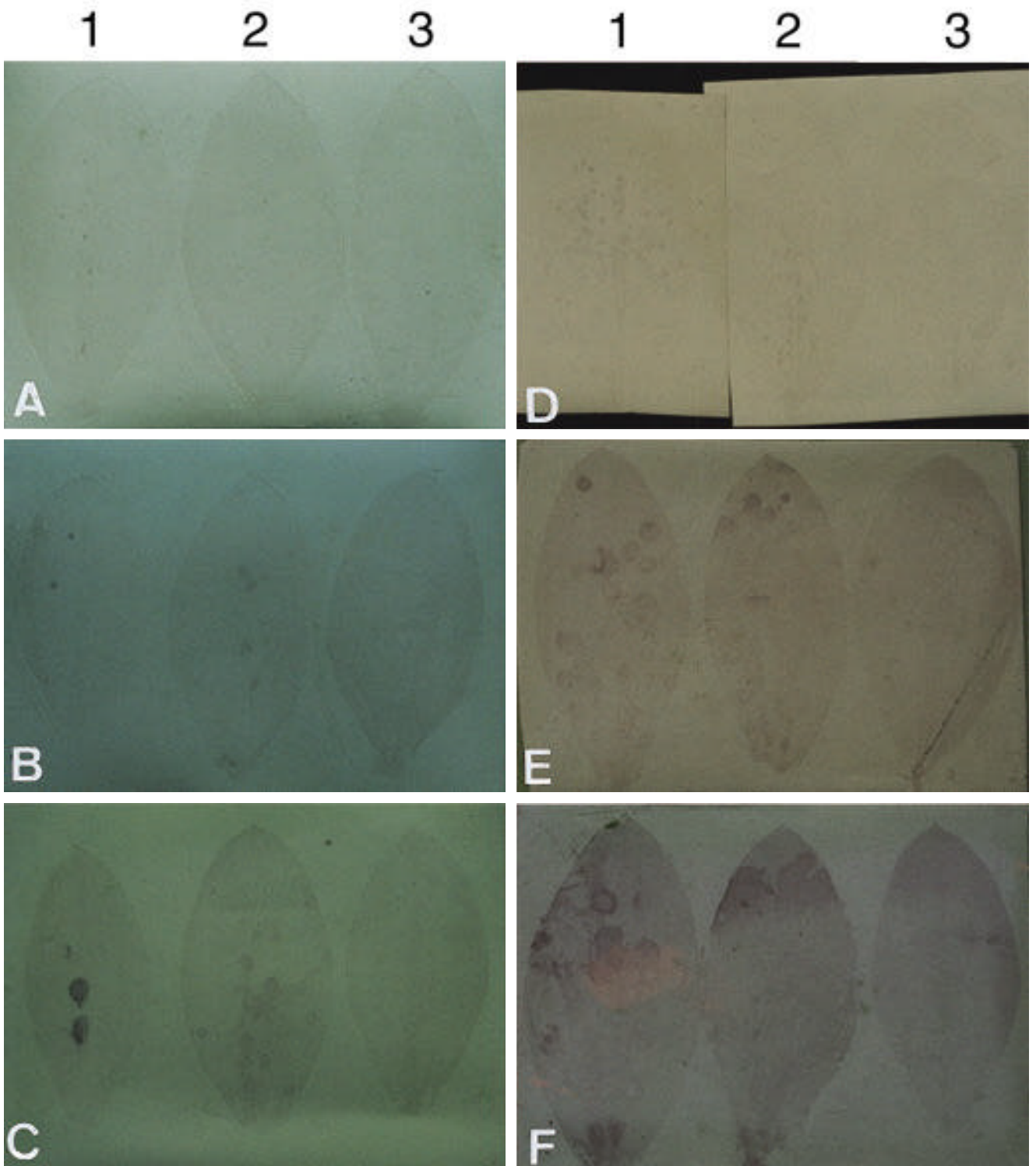
相同之試驗於26進行,接種後第二天接種葉開始出現肉眼可辨識之淡灰白色斑點的病徵,第三天斑點明顯變大且轉呈黃色。以indirect ELISA偵測接種後第一天之接種葉專一性反應並不明顯(6個供試樣本中有一樣本ELISA A405讀值0.543,高於對照0.216,但未達對照組A405讀值的3倍正反應標準),第二及三天之樣本則均呈專一性反應;相同方法偵測接種後第一、二及三天之莖及根樣本均無專一性反應產生。DTB於第一天在轉印於亞硝基樹脂膜呈色後出現許多針狀紫色斑點專一性反應,第二天紫色斑點變大,但斑點數因融合而減少,第三天紫色斑點繼續變大(圖五D、E、F);莖接種後之第一天並無專一性反應產生,但第二天部份樣本,尤其是接近接種葉之第一及二莖節開始在亞硝基樹脂膜上呈紫色專一性反應,第三天則均呈紫色反應專一性反應;接種株之根於第二、三天部份供試樣品顯示有紫色專一性反應。

為進一步了解DTB於接種後之較短有效偵測時間,

試驗於21及26進行,並以洋桔梗葉片為偵測對象。於26機械接種後1,6及12小時以DTB偵測結果,顯示於接種後12小時開始於靠近葉基部之主脈附近出現少數極細之針狀紫色斑點專一性反應,對照健康則無;而21接種後1,6及12小時之葉片則均無專一性反應產生(表一)。根據以上結果,LNV罹病葉片粗汁液機械接種洋桔梗後,以DTB偵測LNV複製之新抗原明顯較indirect ELISA早。

討 論

本省已記錄感染洋桔梗之病毒計有六種,其中三種為絲狀或桿狀病毒,分別是菜豆黃化嵌紋病毒(*bean yellow mosaic virus*)⁽⁴⁾、蕪菁嵌紋病毒(*Turnip mosaic virus*)⁽³⁾及煙草嵌紋病毒(*Tobacco mosaic virus*)⁽²⁾。另三種小型球形病毒為胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*)⁽¹⁾、蠶豆萎凋病毒(*Broad bean wilt virus 2*)⁽⁶⁾及洋桔梗壞疽病毒(LNV)⁽⁵⁾。LNV是晚近在中部地區洋桔梗上發現的新病毒⁽⁵⁾,由於洋桔梗栽培使用之種苗多由國外進口,因此病毒伴隨種苗進口而侵入國內的可能性不能排除,此為疫病蟲進口檢疫之問題,如欲進行種苗檢疫則病毒偵測技術的建立是不可缺少的工具之一。



圖五、洋桔梗壞疽病毒機械接種於洋桔梗後以組織轉漬法偵測試驗。洋桔梗幼苗於 21 (A-C) 及 26 (D-F) 機械接種洋桔梗壞疽病毒 (LNV)，接種後 24 (A, D)、48 (B, E) 及 72 (A, D) 小時取樣接種葉片進行轉漬試驗。每一接種處理取樣 2 葉片，健康對照取樣 1 葉片，撕取表皮轉漬於亞硝基樹脂膜，隨後分別加入 LNV 兔子抗血清球蛋白及鹼性磷酸酵素標示之山羊抗兔子免疫球蛋白。

Fig. 5. Direct tissue blot detection of *Lisianthus necrosis virus* (LNV) in virus-inoculated *Eustoma rusellianum* grown at 21 (A-C) and 26 (D-F). Leaves were sampled from plants 24 (A and D), 48 (B and E) and 72 (C and F) hr after inoculation. Two inoculated leaf blots (left) and a healthy control (right) were prepared on PVDF membranes after removal of epidermal cell layers, blocked, and incubated with rabbit anti-LNV IgG and alkaline phosphatase goat anti-LNV IgG before being developed in substrate solution.

表一、比較以間接酵素聯結法及直接組織轉漬法偵測洋桔梗壞疽病毒之效力

Table 1. Symptom development and enzyme-linked immunosorbent (ELISA) and direct tissue blot (DTB) assays of *Lisianthus necrosis virus* in leaves, stem, and root of inoculated lisianthus

Inoculation Temperature ()	Times after inoculation (hr)	Symptom appearance	Leaf		Stem		Root	
			ELISA	DTB	ELISA	DTB	ELISA	DTB
21	1	- ¹	-	-	NT	NT	NT	NT
21	6	-	-	-	NT	NT	NT	NT
21	12	-	-	-	NT	NT	NT	NT
21	24	-	-	+	-	-	-	-
21	48	-	-	+	-	+	-	-
21	72	+	+	+	-	+	-	+
26	1	-	-	-	NT	NT	NT	NT
26	6	-	-	-	NT	NT	NT	NT
26	12	-	-	+	NT	NT	NT	NT
26	24	-	-	+	-	-	-	-
26	48	+	+	+	-	+	-	+
26	72	+	+	+	-	+	-	+

¹. + :positive reaction; - :negative reaction; NT: not test

本試驗利用橙綠蛋白質染劑染色法（光學顯微鏡觀察）、陰染及超薄切片法（電子顯微鏡觀察）及血清學方法（酵素聯結免疫分析法、組織轉漬法及西方轉漬法）均能偵測到罹病組織內之 LNV，且反應明確。就實際應用而言，使用酵素聯結免疫分析法（ELISA）較為迅速又可同時偵測較多之樣本，但為保證鑑定之品質，經 ELISA 初步診斷之結果必要時得再藉由電子顯微鏡直接觀察罹病組織或其他的偵測方法加予佐證，其結果可信度會更高。血清學方法如 ELISA、dot-blot immunoassy 及免疫電子顯微鏡（ISEM）等技術被廣泛應用於植物病毒診斷^(9,10,17,19,20,21)，其中 ELISA 幾乎可偵測每一種植物病毒⁽⁹⁾。本試驗純化 LNV 鞘蛋白（38 kDa）做為抗原製備兔子抗血清或以 LNV 老鼠單元抗體應用於 ELISA、Western blot、direct tissue blot（DTB）及 ISEM⁽⁵⁾ 均能有效偵測到罹病組織內之 LNV 抗原，但由於老鼠單元抗體可以不斷地培養供應，在實際應用上更計具有價值。

LNV 機械接種於洋桔梗後，以 DTB 偵測結果顯示在高溫（26 °C）情況下接種比低溫（21 °C）病斑多且病斑較大（圖五），此可能說明在高溫時，病毒複製較快且複製之量較多。在 26 °C，機械接種 LNV 於洋桔梗，以 indirect ELISA 及 DTB 比較其偵測 LNV 之效率，結果 DTB 於接種後 12 小時即能偵測到新複製之病毒，而 indirect ELISA 則於接種後 48 小時始能明確偵測到病毒（表一），顯然 DTB 能較早偵測到病毒。ELISA 雖具有前述之優點，但它仍受限於實驗室進行，而 DTB 則不受此項限制，它可於田間或苗圃立即取樣並進行檢測，由於其能較早期偵測到病毒且操作簡便，對於抗病毒育種選拔、大量健康種苗生產之早期發現病毒，在種苗管理上確具有發展之潛力及實用之價值。

引用文獻

1. 陳慶忠、胡仲祺. 1999. 洋桔梗上胡瓜嵌紋病毒之分離及鑑定. 植保會刊 41:179-198.
2. 趙佳鴻、陳慶忠. 2001. 感染洋桔梗之 Tobamovirus 病毒之鑑定. 台中區農業改良場 89 年度試驗暨推廣論文發表會（民國 90 年 1 月 18-19 日）論文集 p.7（摘要）.
3. 趙佳鴻、陳慶忠、張清安、陳金枝. 2000. 感染洋桔梗之蕪菁嵌紋病毒之鑑定. 植物病理學會刊 9:115-122.
4. Chang, C. C. 1993. Isolation of bean yellow mosaic virus from *Lisianthus* developing foliar mosaic and flower breaking symptoms. *Plant Pathol. Bull. (Taiwan)* 2:250-251 (abstract).
5. Chen, C. C., Chen, Y. K., and Hsu, H.T. 2000. Characterization of a virus infecting *lisianthus*. *Plant Dis.* 84:506-509.
6. Chen, C. C., Hu, C. C., Chen, Y. K., and Hsu, H. T. 2001. Characterization of a virus inducing ring spot disease in *Lisianthus*. *Acta Horticult. (in press)*
7. Christie, R. G., and Edwardson, J. R. 1977. Light and Electron Microscopy of Plant Virus Inclusions. *Fla Agric. Exp. Stn. Monoger. No.9.* 150 pp.
8. 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. Agric. Exp. Stn. Bull. No. 872.* 45pp.
9. Converse, R. H., and Martin, R. R. 1990. ELISA Methods for plant Viruses. Page 179-196 *in: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens.* R. Hampton, E. Ball, and S. De Boer, eds. APS Press, ST. Paul, MN. 389 pp.
10. Derrick, K. S. 1973. Quantitative assay for plant viruses

- using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56:652-653.
11. Dijkstra, J., De Jager, Cees P. 1998. *Practical Plant Virology* "Protocols and Exercises" Springer 459 pp.
 12. Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein blotting. Pages 165-178 in: *Methods in Molecular Biology*, Vol 1. J. M. Walker, ed. Humana Press, Clifton, NJ.
 13. 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.
 14. Hsu, H. T., and Lawson, R. H. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens*. *Plant Dis.* 75:292-295.
 15. 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.
 16. Iwaki, M., Maria, E. R. A., Hanada, K., Onogi, S., and Zenbayashi, R. 1985. Three viruses occurred in lisianthus plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 52:355.
 17. Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55:53-62.
 18. Lin, N. S., Hsu, Y. H., and Hsu, H. T. 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80:824-828.
 19. 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.
 20. Milne, R. G., and Luisoni, E. 1975. Rapid high resolution immune electron microscopy of plant viruses. *Virology* 68:270-274.
 21. Power, C. A. 1987. Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay. *Phytopathology* 77:306-309.

ABSTRACT

Chen, C. C.^{1,3}, Tsao, S. L.¹ and Hsu, H. T.² 2001. Diagnosis of *Lisianthus necrosis virus* infection by light and electron microscopy and serological assays. Plant Pathol. Bull. 10:105-114 (¹ Taichung District Agricultural Improvement Station, Tatsuan, Changhua, Taiwan; ² U.S. Department of Agriculture, Beltsville Agricultural Research Center, Floral and Nursery plants Research Unit, Beltsville, MD 20705-2350 ; ³ Corresponding author, E-mail: Chence@tdais.gov.tw; Fax: +886-4-8521140)

Lisianthus necrotic virus (LNV) is a spherical virus recently found and identified in certain imported lisianthus seedlings in central Taiwan. In this study, diagnostic procedures, including light and electron microscopy (TEM) and serological techniques, were compared for detection and identification of LNV in virus-infected plants. Light microscopy showed the presence of cytoplasmic inclusion-like structures with boundless shapes in epidermal cells of leaves of infected lisianthus when stained with Calcomine orange-Luxol brilliant green BL. TEM of leaf dip preparations of infected plants or purified samples of LNV stained with 2% uranyl acetate revealed the presence of spherical particles measuring about 32 nm in diameter. Similar particles or virions aggregation were observed in cytoplasm of leaves and petals of infected plants in ultra-thin sections. In Western blot analysis using rabbit antisera or mouse monoclonal antibodies, a single capsid protein (about 38 kDa, MWr) band was detected in crude leaf extracts of infected plants and purified virus preparation. In indirect ELISA using rabbit antisera or mouse monoclonal antibodies, the dilution endpoints of LNV antigens in leaf extracts of infected plants were about 10^{-4} or 10^{-5} . Similar dilution endpoints of LNV antigens were also obtained when mouse antibody was used in TAS-ELISA. As early as 12 hr after inoculation, localization of newly synthesized LNV antigen was visualized by direct tissue blot immunoassay, whereas the LNV antigen could not be detected by ELISA test until 48 hr after inoculation.

Key words : diagnosis methods, *Lisianthus necrosis virus*