

康乃馨無病徵病毒之分離與鑑定

姚國山¹ 梁耀光² 盧耀村¹

1. 台中市 國立中興大學植物病理學研究所

2. 台南市 台灣省糖業研究所植物保護系

接受日期：中華民國 82 年 7 月 20 日

摘 要

姚國山、梁耀光、盧耀村，1993。康乃馨無病徵病毒之分離與鑑定。植病會刊 2:119-127。

將生長勢不良康乃馨植株之葉片，以汁液機械接種至番杏科 (Aizoaceae)、莧科 (Amaranthaceae)、藜科 (Chenopodiaceae)、石竹科 (Caryophyllaceae)、菊科 (Compositae)、豆科 (Leguminosae)、葫蘆科 (Cucurbitaceae)、酢醬草科 (Oxalidaceae) 和茄科 (Solanaceae) 等共 9 科 31 種植物，只有藜科植物產生黃化局部病斑，再由回接試驗及電顯觀察而知，石竹科和莧科受到潛伏性的感染，其它測試植物則不感染。在電子顯微鏡下觀察所得病毒粒子呈長絲狀長短介於 720-790 nm 之間，而在感病組織之細胞質內有 pinwheels、scrolls 和 laminated aggregates 等形態的內含體存在。另外，利用 SDS-PAGE 分析病毒鞘蛋白，得知其分子量約為 34,000 (34K)。利用間接式酵素連結抗體 (indirect-ELISA) 法，偵測本病毒與 Potyvirus 群其它病毒以及與 Carlavirus 群病毒之血緣關係，結果本病毒和 BYMV (bean yellow mosaic virus)、PRSV (papaya ringspot virus)、ZYMV (zucchini yellow mosaic virus)、PVY (potato virus Y)、ChVMV (chili veinal mottle virus)、PVMV (pepper veinal mottle virus)，以及 PVS (potato virus S)、GLV (garlic latent virus)、LSV (lily symptomless virus) 等均無血緣關係。由寄主範圍、病毒形態大小、細胞質內含體之形態與病毒鞘蛋白分子量之結果顯示，本省所發生的康乃馨無病徵病毒與國外所報告之康乃馨葉脈斑駁病毒 (carnation vein mottle virus, CVMV) 相類似，但二者在石竹科之康乃馨和五彩石竹與莧科之千日紅植株上的病徵表現，則仍有所不同。

關鍵詞：康乃馨，康乃馨無病徵病毒，ELISA。

緒 言

康乃馨 (*Dianthus caryophyllus* L.) 別名香石竹、麝香石竹、紅茂草和丁香等，屬於石竹科 (Caryophyllaceae) 一年生或多年生草本植物，栽培方式分一年生種子繁殖及多年生宿根栽培兩種，前者通常應用於庭園，宿根則用於生產切花，是世界上重要的切花植物之一 (1)。康乃馨在本省的栽培以埔里、田中和后里等地區為主，而花農種植康乃馨的種苗來源，主要仰賴荷蘭或日本進口，再以側芽扦插做無性繁殖，此種無性繁殖的方式是病毒傳播的極佳途徑。種苗若未經過嚴格檢查篩選，勢必會在田間造成嚴重的感染。國外的報告指出，感染康乃馨的病毒或類病毒 (viroid) 種類甚多，包括康乃馨潛隱性病毒 (carnation cryptic virus, CCV) (20)、康乃馨蝕刻輪紋病

毒 (carnation etched ring virus, CERV) (18)、康乃馨意大利輪斑病毒 (carnation Italian ring-spot virus, CIRSV) (15)、康乃馨潛伏病毒 (carnation latent virus, CLV) (27)、康乃馨斑駁病毒 (carnation mottle virus, CarMV) (12)、康乃馨壞疽條斑病毒 (carnation necrotic fleck virus, CNFV) (16)、康乃馨黃化條斑病毒 (carnation yellow fleck virus, CYFV) (21,24)、康乃馨輪斑病毒 (carnation ringspot virus, CRSV) (25)、康乃馨葉脈斑駁病毒 (carnation vein mottle virus, CVMV) (13)、康乃馨黃化條紋病毒 (carnation yellow stripe virus, CYSV) (11)、康乃馨 Streak 病毒 (carnation streak virus) (7) 和康乃馨 bacilliform 病毒以及康乃馨矮化類病毒 (carnation stunt viroid) (6,19) 等，而國內已記載的卻只有 CERV 和康乃馨輕微嵌紋病毒 (carnation mild mosaic virus, CMMV) 二種球形病毒 (2,4)。為瞭解在

本省的康乃馨生長不良之原因，同時建立本省康乃馨病毒病害資料，乃而進行本試驗。

材料與方法

材料來源

白糖業研究所採集之康乃馨病株葉片，以10倍量(w/v)之0.1 M 磷酸緩衝液(pH 7.2)研磨，機械接種至番杏(*Tetragonia expansa*)、千日紅(*Gomphrena globosa*)和紅藜(*Chenopodium amaranticolor*)等判別植物，經7天後在紅藜接種葉產生局部病斑，再經三次單斑分離，保存於紅藜植株上，供為接種源。健康的康乃馨種子購自台南藝霖種苗公司，而五彩石竹(*D. chinensis*)種子購自農友種苗公司，種子均勻撒播於3號蛭石，置於20℃生長箱，經8天發芽，待其長出本葉3-4片後，行第一次移植於網室中，供試驗之用。

寄主範圍測定

將保存於紅藜植株上之病毒，以上述緩衝液機械接種至番杏科(Aizoaceae)、莧科(Amaranthaceae)、藜科(Chenopodiaceae)、石竹科(Caryophyllaceae)、菊科(Compositae)、豆科(Leguminosae)、葫蘆科(Cucurbitaceae)、酢醬草科(Oxaliaceae)和茄科(Solanaceae)等共9科31種植物(表一)，接種後3-4週內連續觀察接種植株的反應，並且將接種植株汁液可接至紅藜以判別其感染情形，同時利用電子顯微鏡以陰染法觀察有無病毒粒子的存在。

病毒之純化及多元抗體之製備

病毒純化：參考 Hollings & Stone (13), Poupet & Marais (22), 以及 Raj 等 (23) 純化 CVMV 的方法，取產生單斑之紅藜病葉 30 g，加入3倍量(w/v)之0.5 M 磷酸鉀緩衝液(pH 7.2)，內含0.01 M disodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA)及0.1% 2-mercaptoethanol (2-ME)，研磨後經四層紗布過濾，再加入5% (v/v)之1,1,2-trifluoro-1,2,2-trichloroethane，至4℃攪拌2分鐘後，經8,000 g 離心20分鐘，收集其上澄液，加入1% Triton X-100並攪拌2分鐘後，再經11,000 g 離心20分鐘，收集其上澄液，經60,000 g 離心90分鐘，繼以10倍稀釋之原緩衝液1 ml懸浮沉澱物，低速離心去除雜質後，再經 Sepharose CL-4B (0.9 × 60 cm)管柱，在波長254 nm下(ISCO UA-5)監視與記錄，收集具有吸收峰之試液，分別接種於紅藜，測試有無病原性，並以電子顯微鏡觀察病毒粒子之形態與大小，判定其種類或所屬族群。

表一、康乃馨無病徵病毒在不同植物上之反應

TABLE 1. Host reactions of carnation symptomless virus

Indicators	Reaction ¹
Aizoaceae	
<i>Tetragonia expansa</i> Thunb.	—
Amaranthaceae	
<i>Gomphrena globosa</i> L.	SI
Caryophyllaceae	
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	SI
<i>Dianthus chinensis</i> L.	SI
Chenopodiaceae	
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn.	CLL
<i>Chenopodium murale</i> L.	ICB
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	CLL
Compositae	
<i>Dahlia pinnata</i> Cav.	—
<i>Wedelia biflora</i> (L.) DC.	—
Cucurbitaceae	
<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad. var. Ten-Bow	—
<i>Cucumis sativus</i> L. var. Green-Mountain	—
<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	—
<i>Luffa cylindrica</i> Roem.	—
Leguminosae	
<i>Arachis hypogaea</i> L.	—
<i>Cassia occidentalis</i> L.	—
<i>Vigna sinensis</i> (L.) Savi ex Hassk.	—
Oxalidiaceae	
<i>Oxalis corymbosa</i> DC.	—
Solanaceae	
<i>Capsicum annuum</i> L. var. Blue-Star	—
<i>Datura metel</i> L.	—
<i>Datura stramonium</i> L.	—
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. var. Farmer 301	—
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.	—
<i>Nicotiana debneyi</i> L.	—
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	—
<i>Nicotiana rustica</i> L.	—
<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. TT-5	—
<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. Vam-Hicks	—
<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. White Burley	—
<i>Pectunia hybrida</i> Vilm.	—
<i>Physalis floridana</i> L.	—
<i>Solanum melongena</i> L.	—

¹ CLL=chlorotic local lesion, SI=symptomless infection, ICB=irregular chlorotic blotch, —=no infection.

多元抗體製備：收集具有病原性之病毒懸浮液 1 ml，調節其濃度為 0.51 mg/ml，加入等體積之 complete Freund's adjuvant 混合乳化後，對紐西蘭白兔進行肌肉免疫注射，二星期後注射同量之病毒與 incomplete Freund's adjuvant 混合乳化液，而後每隔一星期進行同樣免疫注射，直到第四次免疫注射後第七天行耳朵採血，所得血液放置 37 °C 1 小時，經 6,000 rpm 離心 10 分鐘，收集上澄液，即為病毒之多元抗體。

間接式酵素連結抗體反應 (indirect-ELISA)

參考 Clark 等 (9) 利用間接式 ELISA 偵測植物病毒的方法，將產生單斑之紅藜病葉，以 10 倍量之 coating buffer (1 L 中含 1.59 g Na_2CO_3 , 2.93 g NaHCO_3 , 0.2 g NaN_3) 研磨後，作一系列稀釋，分別吸取稀釋液 200 μl 加於 ELISA 微量盤 (Corning ELISA Plate) 之小穴中，在 37 °C 下反應 6 小時，繼以 PBST (phosphate buffered saline, pH 7.4, 內含 0.05% Tween 20) 清洗三次，加入供試抗體之稀釋液，每一穴用量亦為 200 μl 。將微量盤移至 4 °C 下過夜，再以 PBST 重覆清洗三次後，每洞分別加入 2,000 倍稀釋經過鹼性磷酸酶標識之山羊抗兔子免疫球蛋白 (goat anti-rabbit immunoglobulin alkaline phosphatase conjugate, Sigma) 之試液，每小穴 200 μl ，置微量盤於 37 °C 下 6 小時，重覆 PBST 清洗步驟後，每穴加入等量之鹼性磷酸酶基質試液 (disodium p-nitrophenyl phosphate, Sigma)，反應 60 分鐘後，每洞加入 50 μl 之 3 M NaOH，使呈色反應停止，以 ELISA reader (Dynatech Laboratories Inc. MR 700) 在波長 405 nm 測其吸收值。

本試驗使用之病毒抗體有：由農試所張清安博士提供 bean yellow mosaic virus (BYMV) 抗體及鄧汀欽先生提供大蒜潛伏病毒 (garlic latent virus, GLV) 抗體，以及本系葉錫東教授提供木瓜輪點病毒 (papaya ringspot virus, PRSV) 抗體和本研究室保存之馬鈴薯病毒 Y (PVY) 抗體、馬鈴薯病毒 S (potato virus S, PVS)、百合無病微病毒 (lily symptomless virus, LSV) 抗體、矮南瓜黃化嵌紋病毒 (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) 抗體和已製備之康乃馨病毒抗體等，分別以 conjugate buffer (PBS, 內含 2% polyvinylpyrrolidone, MW 40,000, 0.2% ovalbumin) 稀釋 1,000 倍後供使用。

電子顯微鏡觀察

陰染法：參考 Christie 等 (8) 的方法，取經 Sepharose CL-4B 管柱純化，具有病原性之試液，或直接切取罹病組織，或切取經接種而無病徵之葉片約 2 × 2 mm 大小，以 20 μl 之 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 研磨，取 10 μl 之粗汁液置於銅網上，3 分鐘後，以

10 滴去離子水洗去雜質，利用 2% 醋酸鈷染色 10 秒鐘，以電子顯微鏡 (JEOL 200 CX) 觀察有無病毒粒子的存在。

超薄切片法：將罹病之康乃馨葉片，切成約 1.5 × 1.5 mm 大小之組織塊，依照梁 (4) 所述之方法予以固定、包埋、切片及染色，在電子顯微鏡下觀察內含體之形態。

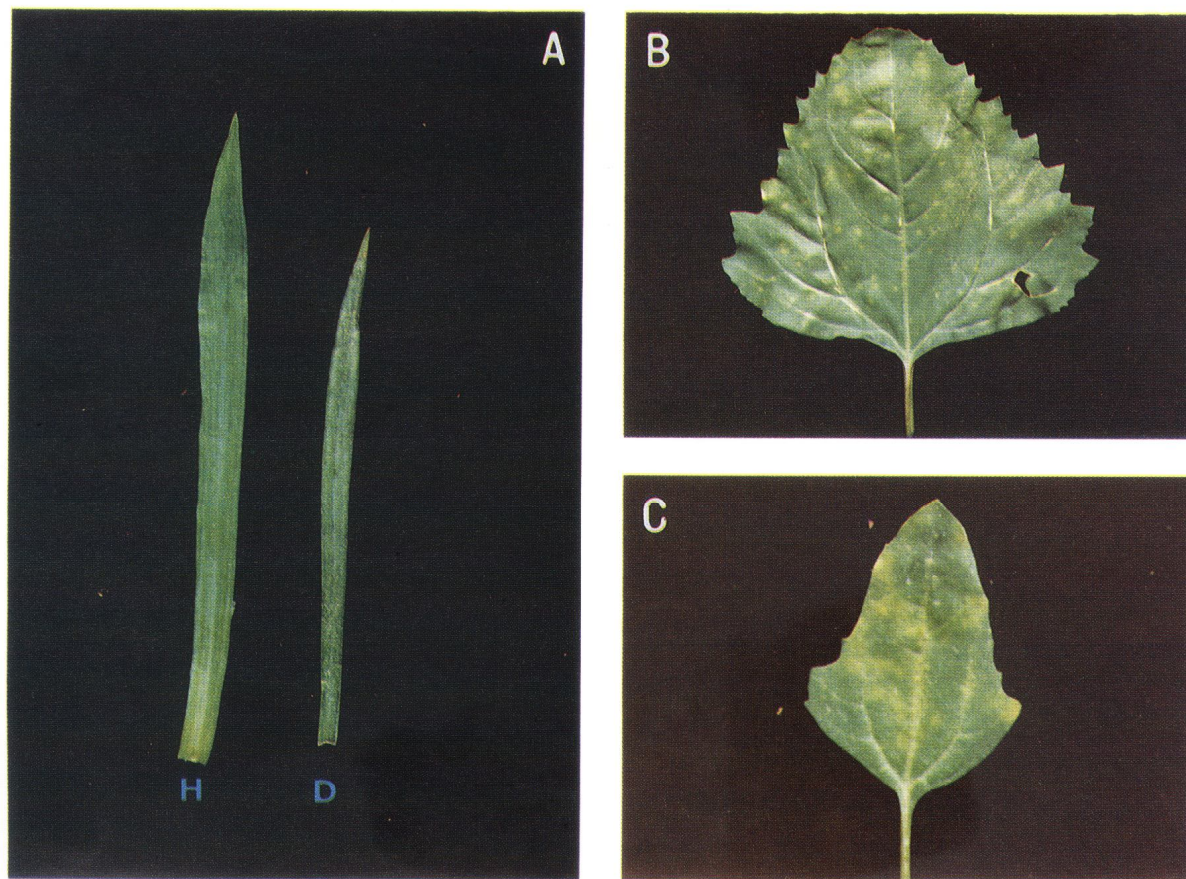
病毒鞘蛋白分子量之測定

取上述經過純化之病毒試液，以 4 倍解離緩衝液 (0.4 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% 2-ME, 40% glycerol, 0.005% bromophenol blue) (5) 在 100 °C 加熱 5 分鐘解離後，利用 SDS 不連續聚丙烯醯胺膠體電泳法 (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)，進行迷你式膠體電泳，10% 濃度之內烯醯氨不連續膠體及其緩衝液之配製均依照 Laemmli (17) 之方法。以 100 伏特電壓，進行泳動 70 分鐘後之膠片，依莊 (3) 染色和脫色之方法，利用 Coomassie brilliant blue R250 (CBR 250) 染色液染色 30 分鐘後，再以脫色液脫色，同時以 myosin (200K), phosphorylase (97.4K), bovine serum albumin (69K), ovalbumin (46K), carbonic anhydrase (30K), trypsin inhibitor (21.5K) 和 lysozyme (14.3K) 等作為標準分子量之標記蛋白 (molecular weight marker)，測定病毒鞘蛋白之分子量。

結 果

寄主之反應

以汁液機械接種測定寄主範圍，結果如表一所示，在接種的 9 科 31 種植物中，石竹科之康乃馨於接種後生長勢不良 (圖一 A)，而五彩石竹以及堇科之千日紅經連續 3 週的觀察，未見病徵的表現 (表一)，經回接至紅藜植株上測試，則只產生少量單斑，另外利用電顯陰染法觀察，每個視野可發現 2-3 長絲狀病毒粒子存在，顯示在此三種寄主植物，病毒引起潛伏性感染。然而在藜科之紅藜 (*C. amaranticolor*) 和奎藜 (*C. quinoa*) 植株的接種葉上，於接種七天後產生大小為 1.0-1.5 mm 的黃化局部病斑 (圖一 B,C)；而在綠藜 (*C. murale*) 接種葉上，接種後第八天產生不規則大小的黃化病斑，直到第十五天，接種葉完全黃化。而其它供測試之植株共 6 科 25 種均無病徵的表現，回接至紅藜植株上無單斑產生，利用電顯陰染法觀察，亦無病毒粒子的存在。



圖一、康乃馨無病徵病毒在不同寄主之病徵。(A)在康乃馨上無明顯病癥；(B)紅藜產生黃化局部病斑；(C)奎藜產生黃化局部病斑。

Fig. 1. Symptoms of carnation symptomless virus on differential hosts. (A) *Dianthus caryophyllus* showing symptomless infection. H=healthy, D=diseased. (B) Chlorotic local lesions on a leaf of *Chenopodium amaranticolor*. (C) Chlorotic local lesions on a leaf of *C. quinoa*.

電子顯微鏡觀察及病毒鞘蛋白分子量之測定

經 Sepharose CL-4B 管柱純化後之試液，在波長 254 nm 監視下得到三個吸收峰，分別利用紅藜接種測試病原性及以陰染法作電顯觀察，發現只有第一吸收峰試液，具有病原性及長絲狀病毒粒子的存在(圖二)，而另二個吸收峰則含不定形植物成分，亦無病原性。經計算 100 個病毒粒子，發現其長短主要分布在 720-790 nm 之間，約佔 87%(圖三)。

另外，康乃馨罹病組織經超薄切片染色後，在電顯下觀察結果顯示，在細胞質內有 pinwheels、scrolls 以及 laminated aggregates 等形態的內含體存在(圖四)。

以 SDS-PAGE 電泳分析，得知病毒鞘蛋白分子量約為 34,000 (34K)(圖五、Lane B)，與 Potyvirus 群的病毒鞘蛋白分子量大小相符。

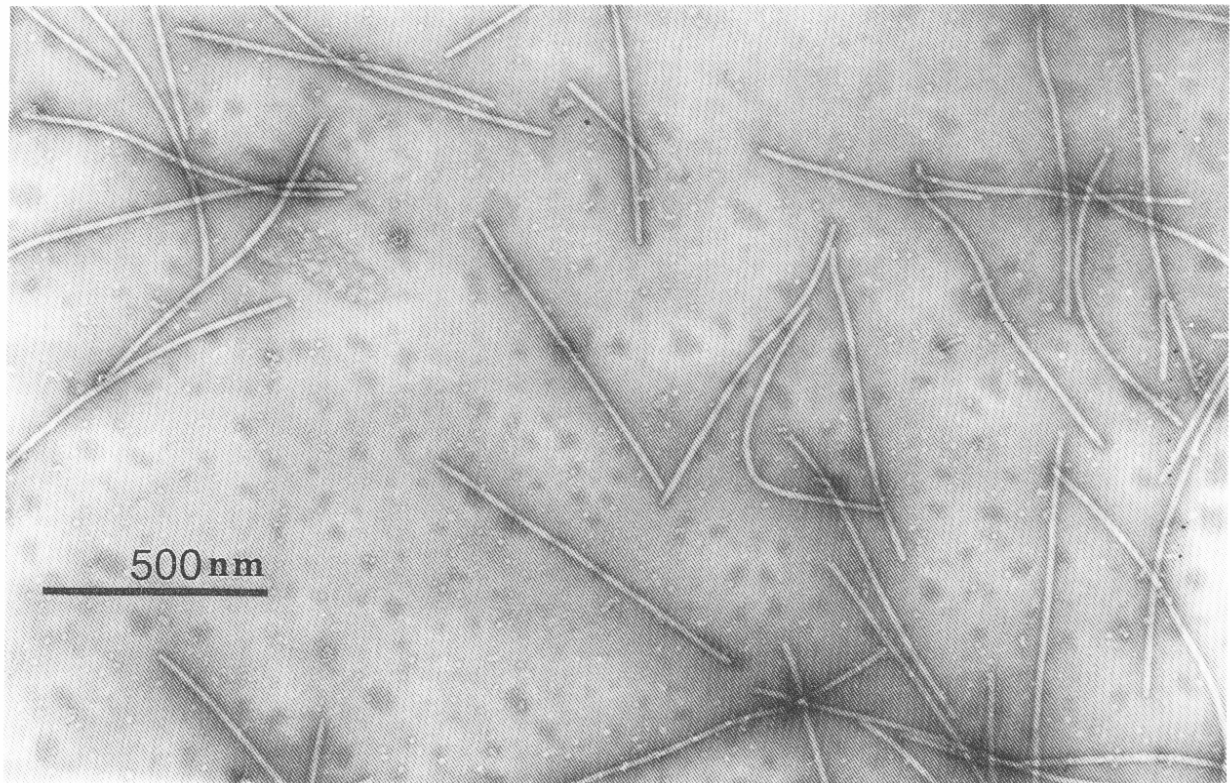
間接式酵素連結抗體反應

由康乃馨無病徵植株分離所得之絲狀病毒，從其粒子形態與鞘蛋白分子量大小得知，與 Potyvirus 群之

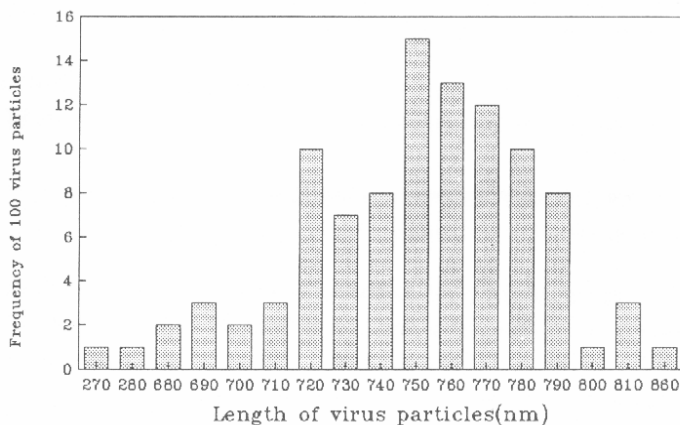
CVMV 或 Carlavirus 群之 CLV 較類似。欲瞭解此病毒與 PRSV, BYMV, PVY, ZYMV, PVS, GLV 和 LSV 等病毒之血緣關係，所以利用間接式酵素連結抗體(indirect-ELISA)法進行偵測，結果顯示，由康乃馨無病徵植株分離所得之長絲狀病毒與 PRSV, BYMV, PVY, ZYMV, PVS, GLV 和 LSV 等病毒的抗體並無反應，唯有與該病毒免疫兔子所製備之抗體有反應(圖六)，顯示此病毒與上述七種植物病毒並無直接的血緣關係。

討 論

感染康乃馨的病毒分別屬於 Carmovirus, Caulimovirus, Cryptovirus, Dianthovirus, Tombusvirus, Necrovirus, Carlavirus, Potyvirus 和 Closterovirus 等 9 個病毒群，其中前 6 個病毒群是為球形病毒，而後 3 個病毒群則為長絲狀病毒。Wetter (27) 指出屬於 Carlavirus 群病毒的 CLV 其寄主範圍，主要局限在石竹科和藜科二科植物；而在藜科的紅藜接種葉上，會



圖二、康乃馨無病微病毒經 Sepharose CL-6B 管柱純化後在電子顯微鏡觀察下之病毒粒子形態。
Fig. 2. Electron microscopy of carnation symptomless virus particles purified by a passage through Sepharose CL-4B column (0.9×60 cm).



圖三、經 Sepharose CL-4B 管柱純化後之康乃馨無病微病毒粒子大小分布。

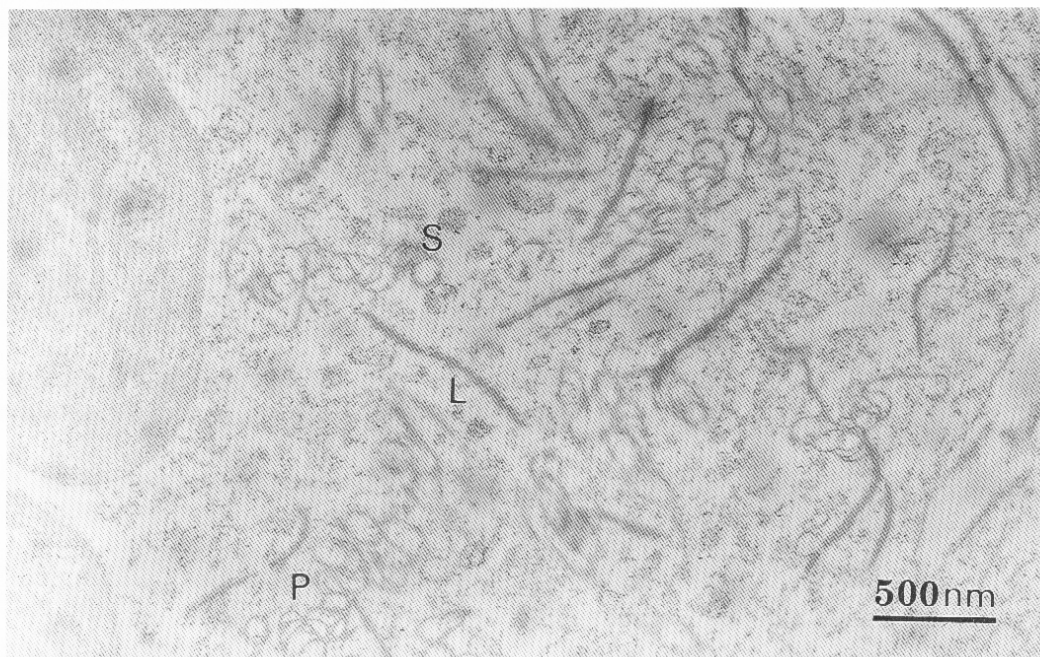
Fig. 3. Size distribution of virus particles purified by a Sepharose CL-4B column.

產生小的黃化局部病斑，非接種葉則呈現系統性的斑駁；在奎藜的接種葉上亦會產生小的黃化斑點，非接種葉則為系統性斑駁以及葉皺縮 (leaf dwarfing)。Inouye (16) 指出屬於 Closterovirus 群病毒的 CNFV 其寄主範圍，主要是局限在石竹科，且不會感染藜科、菊科、葫蘆科、豆科和茄科等植物。Hollings 和 Stone (13)，Hollings 等 (14)，以及 Raj 等人 (23) 描述感染康乃馨的 CVMV，主要引起石竹科之西洋石竹 (barbatus)

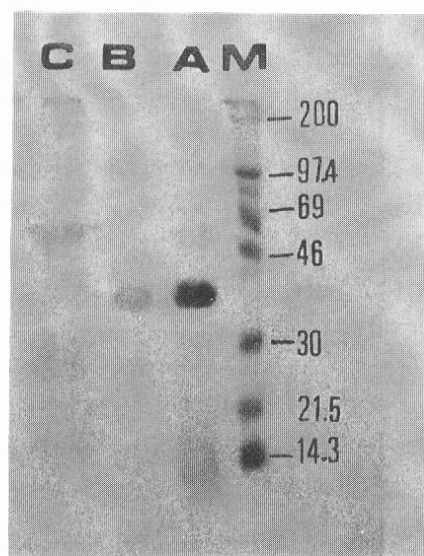
系統性的 vein-clearing 或 chlorotic mottle 的病徵，藜科之紅藜與奎藜接種葉產生大小約 1.0–1.5 mm 的黃化局部病斑，又在莧科之千日紅的接種葉引起不明顯的黃化局部病斑 (faint chlorotic local lesion)，但是有的分離株如西班牙分離株則不感染千日紅，然而在番杏科、藜科 (Polygonaceae)、車前草科 (Plantaginaceae) 和馬齒莧科 (Portulacaceae) 等則為無病徵之潛伏性感染。茄科、酢醬草科和葫蘆科等植物則不會受感染。

本試驗由康乃馨分離所得之病毒，在寄主範圍測試中，只能使藜科之紅藜和奎藜產生 1.0–1.5 mm 大小的黃化局部病斑，使綠藜產生不規則黃化病斑，但不會造成系統性的斑駁現象，其它如茄科、菊科、葫蘆科、豆科和酢醬草科等供試植物則不感染，此與上述 Hollings 等 (14) 和 Raj 等 (23) 所報告感染康乃馨之 CVMV 的寄主範圍，以及在藜科植株所造成的病徵相類似，然而本病毒在石竹科和莧科僅引起無病徵之潛伏性感染。而此結果與上述已報告感染康乃馨之 CLV、CNFV 和 CVMV 等三種絲狀病毒的寄主範圍相比較，則較近似於 Potyvirus 之 CVMV 病毒。

同時，在電顯觀察經過陰染的 100 個病毒粒子中，發現 83 個長絲狀病毒粒子，長度介於 720–790 nm 之間；而經由超薄切片法染色觀察康乃馨之罹病組織，在細胞質內見有類似於 Potyvirus 群病毒典型之細胞質



圖四、康乃馨罹病葉片組織經超薄切片，在電顯下觀察所見細胞質內含體之形態。
Fig. 4. Cytoplasmic inclusions observed from an ultrathin section from a leaf tissue of carnation plant infected with carnation symptomless virus. P: pinwheels, S: scrolls, L: laminated aggregates.



圖五、康乃馨無病徵病毒鞘蛋白之 SDS-PAGE 電泳。
Lane M: 標記蛋白； Lane A: 經超高速離心純化步驟後之試液； Lane B: 經 Sepharose CL-6B 管柱純化後之試液； Lane C: 健全植物對照組。

Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the coat protein of carnation symptomless virus.

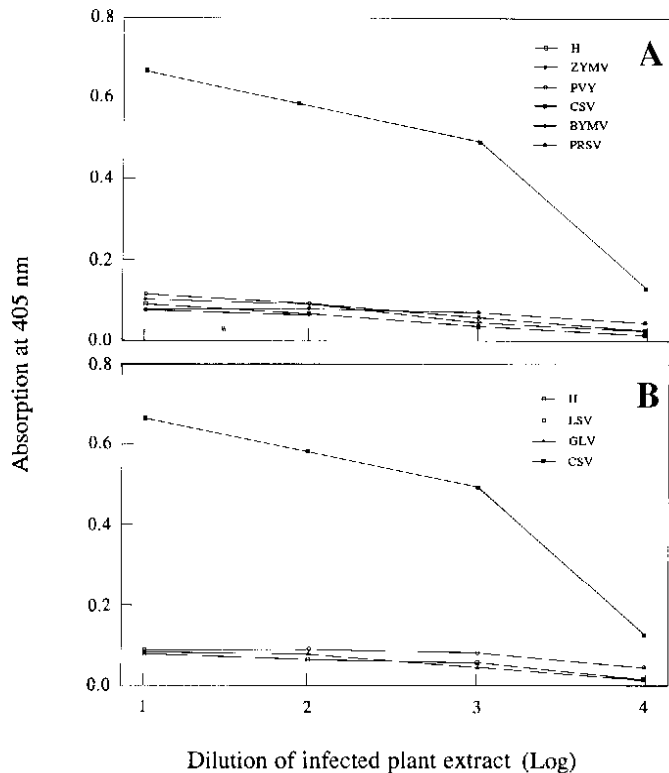
Lane M, molecular weight markers: myosin (200K), phosphorylase (97.4K), bovine serum albumin (69K), ovalbumin (46K), carbonic anhydrase (30K), trypsin inhibitor (21.5K), and lysozyme (14.3K); Lane A: partially purified virus taken after centrifugation at 60,000 g for 90 min; Lane B: purified virus after passage through Sepharose CL-6B column (0.9×60 cm); Lane C: healthy control.

內含體存在。由病毒粒子大小之分布以及病毒內含體之形態得知，本試驗中感染康乃馨之病毒與 Weintraub & Ragetli (26)、Hollings & Stone (13) 以及 Edwardson 等 (10) 所述之 CVMV 相類似，後者大小為 675–850 nm，具有 Potyvirus 群病毒典型的 pinwheels、scrolls 和 laminated aggregates 等形態的細胞質內含體。

雖然白康乃馨之罹病植株分離所得的長絲狀病毒，並不造成五彩石竹和康乃馨明顯病徵，但取接種葉回接紅藜測試其病原性，以及利用電子顯微鏡以陰染法觀察，在紅藜之接種葉上會產生為數不多的黃化局部病斑，而病斑部所作滴液標本在電顯下每個視野亦可觀察到絲狀病毒，表示本病毒為一種無病徵的潛伏感染性病毒，與國外所報告之 CVMV 引起葉脈斑駁病徵不同。其原因可能係與康乃馨之品系，或是病毒分離株，或是環境因子等不同有關。

另外，從病毒鞘蛋白的分子量大小來區別，經 SDS-PAGE 電泳分析，與標準分子量之標記蛋白 (protein molecular weight marker) 比較後，其病毒鞘蛋白分子量約為 34 K，亦與 Hollings 等 (14) 所報告之 CVMV 的病毒鞘蛋白分子量約為 34.7 K 相近。

Hollings 等 (14) 報告指出，感染康乃馨之 CVMV 和 pepper vein mottle virus (PVMV) 有較近的 (more closely) 血緣關係，而和 BYMV、蕪菁嵌紋病毒 (turnip mosaic virus, TuMV)、及西瓜嵌紋病毒-2



圖六、間接式酵素連結抗體反應。

Fig. 6. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay of carantion symptomless virus. The antigen was extracted from virus-infected plants of *Chenopodium amaranticolor* and diluted by a 10-fold series with coating buffer. Antisera were used at a 1:1,000 dilution. Alkaline phosphatase labeled goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG) was used at a 1:2,000 dilution. Results were read 60 min after the addition of the substrate. Antisera produced to the following viruses were used: in (A) bean yellow mosaic virus (BYMV), papaya ringspot virus (PRSV), potato virus Y (PVY), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), and carnation symptomless virus (CSV); in (B) against garlic latent virus (GLV), potato virus S (PVS), and lily symptomless virus (LSV).

(watermelon mosaic virus-2, WMV-2)等病毒有較遠的 (related distantly) 的血緣關係。因此本試驗乃利用 indirect-ELISA 法偵測分離所得之病毒與 BYMV, PRSV, ZYMV, PVY 等 Potyvirus 群病毒，以及 PVS, GLV, LSV 等 Carlavirus 群病毒之血緣關係，由結果得知，此病毒除了與本身抗體有所反應之外，並不與上述其它病毒之抗體出現反應。另外委託由台南亞蔬中心 Green 代為測試本病毒與 PVMV 和 chili veinal mottle virus (ChVMV) 的抗體反應，結果亦無血清反應出現，顯示它們之間並無直接之血緣關係。

綜合以上本病毒之寄主範圍、病毒粒子之形態及長度分布、細胞質內含體之形態和鞘蛋白分子量大小

與 Hollings 和 Stone (13) 以及 Hollings 等 (14) 所報告之 CVMV 相類似。

謝 辭

承蒙台灣省農業試驗所張清安博士和鄧汀欽先生，以及本系葉錫東教授提供抗血清，和亞蔬 Dr. Green 代為測試 PVMV 與 ChVMV 抗血清反應，謹此一併誌謝。

引用文獻

1. 胡醒潔. 1982. 觀花植物(一). 九九出版社. 223 頁。
2. 柯南靖. 1989. 簡易植物病毒診斷圖鑑. 台灣省政府農林廳出版. 109 頁。
3. 莊榮輝. 1985. 水稻蔗糖合成酶之研究. 國立台灣大學農業化學研究所博士論文. 121 頁。
4. 梁耀光. 1988. 康乃馨輕微嵌紋病毒之分離、鑑定及其細胞化學之特性. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 56 頁。
5. 詹富智. 1988. 百香果木質化病毒三種基因產物特性之研究. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 83 頁。
6. Boccardo, G., d'Aquilio, M., Palukaitis, P., Marzachi, C., and Lisa, V. 1988. Infectivity of the viroid-like RNAs associated with the carnation stunting syndrome. *Acta Hort.* 234:109-114.
7. Cadilhac, B., Poupet, A., Cardin, L., and Marais, A. 1975. Cytology of carnation streak virus infection [isolated from *Silene armeria*]. *C. R. Hebd. Seances. Acad. Sci.* 281:639-642.
8. 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.
9. Clark, M. F., Lister, R. M., and Bar-Joseph, M. 1988. ELISA techniques. Pages 507-530 in: *Methods for Plant Molecular Biology*. A. Weissbach, and H. Weissbach eds. Academic Press. London, 543 pp.
10. Edwardson, J. R., Christie, R. G., and Ko, N. J. 1984. Potyvirus cylindrical inclusions-Subdivision-IV. *Phytopathology* 74:1111-1114.
11. Gallitelli, D., Castellano, M. A., Di Franco, A., and Rana, G. L. 1979. Properties of carnation yellow stripe virus, a member of the tobacco necrosis virus group. *Phytopathol. Medit.* 18:31-40.
12. Hollings, M., and Stone, O. M. 1970. Carnation mottle virus. No. 7 in: *Descriptions of Plant Viruses*.

- Commonw. Mycol. Inst. / Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.
13. Hollings, M., and Stone, O. M. 1971. Carnation vein mottle virus. No. 78 in: Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.
 14. Hollings, M., Stone, O. M., Atkey, P. T., and Barton, R. J. 1977. Investigations of carnation viruses. IV. Carnation vein mottle virus. Ann. Appl. Biol. 85:59-70.
 15. Hollings, M., Stone, O. M., and Bouttell, G. C. 1970. Carnation Italian ringspot virus. Ann. Appl. Biol. 65:299-309.
 16. Inouye, T. 1974. Carnation necrotic fleck virus. No. 136 in: Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.
 17. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature (London) 227:680-685.
 18. Lawson, R. H., and Civerolo, E. L. 1977. Carnation etched ring virus. No. 182 in: Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.
 19. Lisa, V., D'Agostino G., and Boccardo, G. 1985. A new disease causing stunting and shoot proliferation in carnation. Acta Hort. 164:63-70.
 20. Lisa, V., Luisoni, E., and Milne, R. G. 1981. A possible virus cryptic in carnation. Ann. Appl. Biol. 98:431-437.
 21. Poncet, C., and Devergne, J. C. 1988. Immunological detection of carnation yellow fleck virus (CYFV) in infected carnations. Acta Hort. 234: 209-219.
 22. Poupet, A., and Marais, A. 1973. Isolation and purification of the carnation vein mottle virus. Ann. Phytopathol. 5(3):265-271.
 23. Raj, S. K., Aslam, M., and Singh, B. P. 1990. Purification and some properties of a virus causing chlorotic mottle disease in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Current Science 59:997-999.
 24. Smookler, M., and Loebenstein, G. 1975. Virus of carnation identified in Israel. Phytopathol. Medit. 14: 1-5.
 25. Tremaine, J. H., and Dodds, J. A. 1985. Carnation ringspot virus. No. 308 in: Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.
 26. Weintraub, M., and Ragetli, H. W. J. 1970. Distribution of viruslike particles in leaf cells of *Dianthus barbatus* infected with carnation vein mottle virus. Virology 40:868-881.
 27. Wetter, C. 1977. Carnation latent virus. No. 61 in: Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. / Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.

ABSTRACT

Yao, K. S.¹, Liang, Y. G.², and Lu, Y. T.¹ 1993. Isolation and identification of carnation symptomless virus. Plant Pathol. Bull. 2:119-127. (1. Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan. 2. Department of Plant Protection, Taiwan Sugar Research Institute, Tainan, Taiwan, R.O.C.)

A virus, designated as carnation symptomless virus (CSV), was isolated from carnation plants (*Dianthus caryophyllus* L.) without showing any foliar symptom. Crude sap from diseased plants was mechanically introduced to 31 indicator species in 9 families including Aizoaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Caryophyllaceae, Compositae, Leguminosae, Cucurbitaceae, Oxalidaceae, and Solanaceae. The plants of Chenopodiaceae showed chlorotic local lesions, while those of the families Caryophyllaceae and Amaranthaceae were latently infected, as determined by back inoculation and electron microscopy. The virus failed to infect other plants tested. The particles of CSV was filamentous, ranging from 720-790 nm in length. The virus could induce cylindrical inclusions containing pinwheels, scrolls and laminated aggregates, as commonly observed with Potyviruses. The molecular weight of coat protein of CSV was 34 K as determined by SDS-PAGE. The serological reactions of CSV were carried out by indirect-ELISA using polyclonal antibodies against different viruses of Potyviruses and Carlaviruses. The result showed that CSV was not reacted with antisera to bean yellow mosaic virus (BYMV), papaya ringspot virus (PRSV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), potato virus Y (PVY), chili vein mottle virus (ChVMV), pepper vein mottle virus (PVMV), potato virus S (PVS), garlic latent virus (GLV), and lily symptomless virus (LSV), except with the homologous antibody. The CSV isolated from stunting carnation plants in Taiwan was similar to the carnation vein mottle virus (CVMV),

based on host reactions, morphology of virus particles and cylindrical inclusions, and the molecular weight of coat protein. However, the symptoms of CSV on *D. caryophyllus*, *D. chinensis*, and *Gomphrena globosa* were somewhat different from CVMV.

Key words: Carnation, Carnation symptomless virus, ELISA.