

朱槿黃脈嵌紋病所分離的疑似 Tobamovirus 之研究

陳滄海^{1,2} 高國華¹ 劉命如¹ 高巧齡¹

1 屏東縣內埔鄉 國立屏東科技大學植物保護系

2 聯絡作者，電子信箱：thchen@mail.npust.edu.tw；傳真：08-7740293

接受日期：90年10月30日

摘要

陳滄海、高國華、劉命如、高巧齡。2001。朱槿黃脈嵌紋病所分離的疑似 Tobamovirus 之研究。植病會刊 10:195-200。

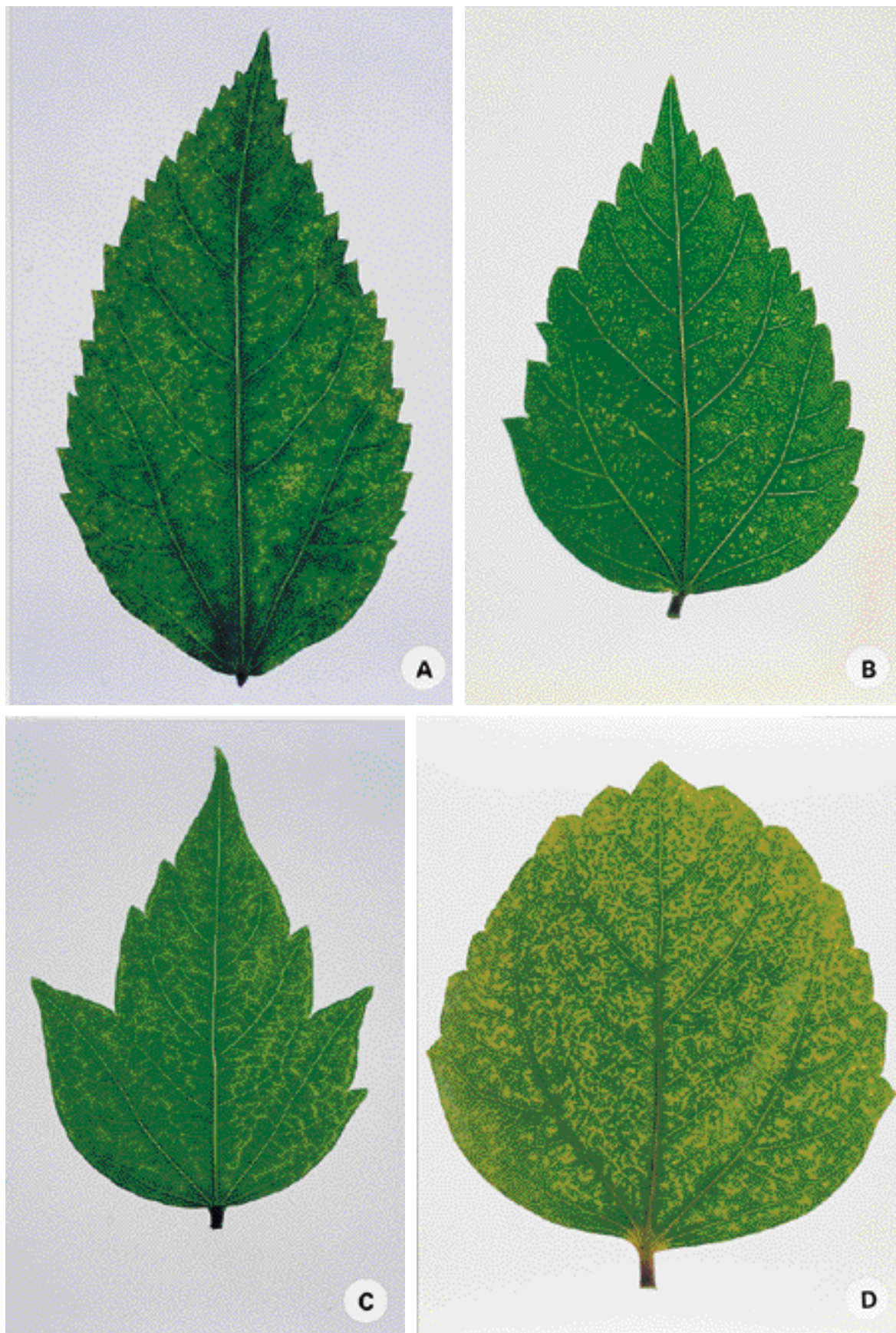
首次由台灣地區罹患黃脈嵌紋病徵的朱槿葉片中分離到一種直桿狀病毒，此病毒極易機械傳播，其寄主範圍很窄，僅限於紅藜、奎藜及綠藜三種藜科植物。病毒粒子為直桿狀，長 300-325 nm。罹患黃脈嵌紋病徵的朱槿病葉以超薄切片電顯觀察，可在細胞質中見到明顯密集分佈之直桿狀病毒粒子存在。以純化之病毒為抗原去注射免疫紐西蘭白兔，可製獲力價 10²⁴ 之抗體，並以之進行免疫瓊脂雙向擴散試驗，結果顯示本研究中之病毒除可與同源抗體發生反應外，並不與 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 及 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) 二種病毒之抗體發生任何反應。依上述病毒粒子形態大小、寄主範圍、田間病徵、血清學反應等性質，將本研究所分得之病毒暫時歸屬於 Tobamovirus 屬之一可能成員，並命名為朱槿黃脈嵌紋病毒 (hibiscus vein yellow mosaic virus)。

關鍵詞：朱槿、*Hibiscus rosa-sinensis*、朱槿黃脈嵌紋病毒、煙草嵌紋病毒屬

朱槿 (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) 又名扶桑、佛桑，為錦葵科 (Malvaceae)，木槿屬之落葉灌木，原產熱帶亞洲地區，變種甚多，至今已有 3000 個以上園藝品種登錄。台灣地區之栽培始於西元 1661 年間由華南引入，慣用扦插法繁殖，乃台灣各地普遍栽植之觀賞及綠籬植物，其根、莖、葉、花更可作為藥材，經濟實用價值頗廣^(1,3)。1996 年筆者等於高屏地區發現朱槿葉片呈現明顯葉脈黃化嵌紋現象，病葉粗汁液經直接負染法電顯鏡檢可見到桿狀病毒粒子，因此初步判定為病毒性病害；國外文獻記載^(6,7,8,11,12)，田間自然感染朱槿之病毒計有 *Tomato vein-yellowing virus* (TVYV)，*Eggplant mottled dwarf virus* (EMDV)，*Hibiscus chlorotic ringspot virus* (HCRSV)，*Hibiscus latent ringspot virus* (HLRSV)，*Okra mosaic virus* (OKMV) 及 *Pittosporum vein yellowing virus* (PVYN) 等五種，分屬 *Nucleorhabdovirus*，*Carmovirus*，*Nepovirus*，*Tymovirus* 等病毒屬，粒子形態為子彈形 (bullet-shaped) 或多面體 (球形)，並無直桿狀病毒之正式記載。而考查國內文獻田間為害朱槿之病毒，僅劉氏於 1982 年簡單提及之球形病毒，*Hibiscus ringspot virus* 一種而已⁽⁴⁾；顯示本文所述乃台灣地區朱槿上一種新發現之病毒，有鑑於此，本文乃針對此一新病毒作一初步探討。

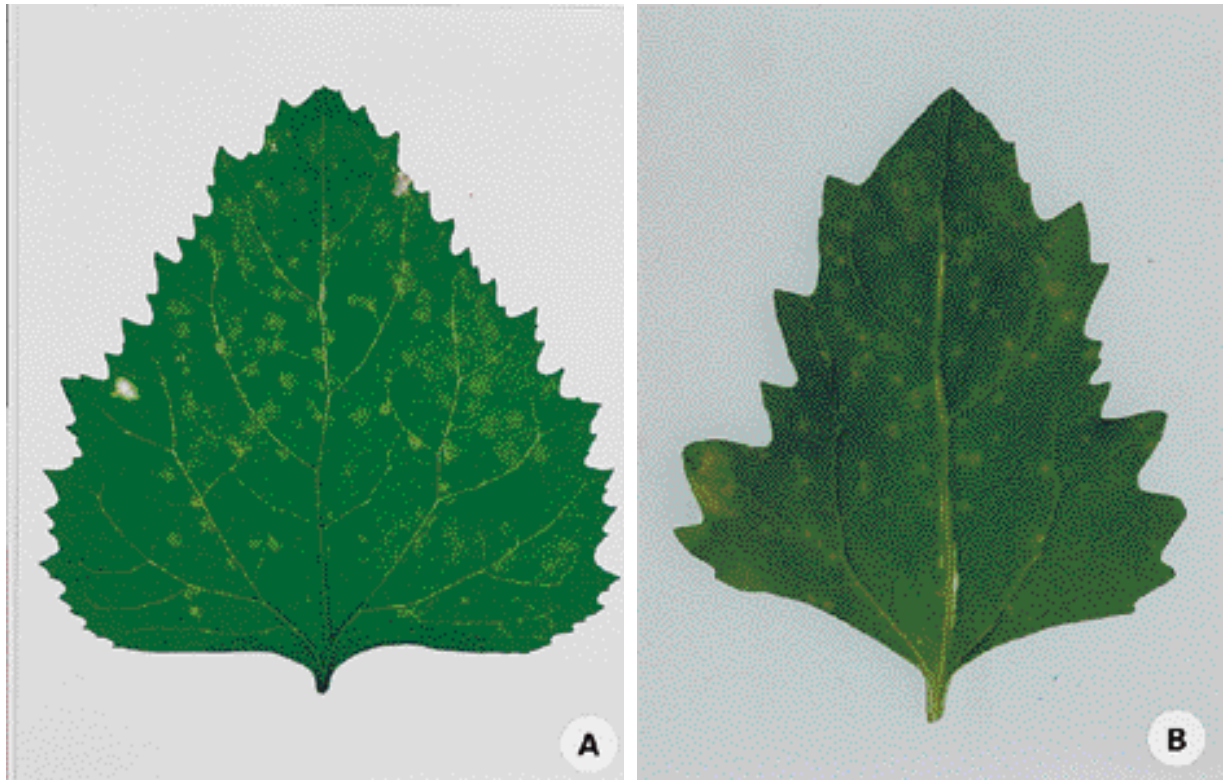
為瞭解台灣田間朱槿病毒病害的病徵及黃脈嵌紋病發

生情形，乃採病徵目視法逢機調查台北、台中、高雄及屏東等四個地區田間朱槿共 1712 株，結果發現不同地區分別有高達 82-93% 植株呈現病毒病或疑似病毒病之病徵，主要病徵為葉片葉脈黃化及嵌紋 (圖一)，一年中以夏季 7-11 月病徵最明顯嚴重，冬季 12-3 月最輕微不明顯，田間病害發生如此普遍，推測應與朱槿習慣皆以扦插繁殖有密切相關。採集前述四個地區田間不同品種黃脈嵌紋朱槿病葉 (圖一) 以 0.1 M pH 7.2 磷酸緩衝液萃取粗汁液，再以摩擦法接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd) 葉片，結果顯示 30 個採自台北、台中、高雄及屏東等不同地區不同品種之朱槿病葉組織皆會在奎藜接種葉片上造成局部性壞疽黃斑 (圖二B)，經連續 3 次單斑分離後皆可得一長形病毒分離株，此病毒經以浸葉法 (leaf-dip method)⁽⁵⁾ 2% uranyl acetate (UA) 負染電顯 (Hitachi H-600 TEM) 觀察，結果發現粒子為直桿狀，主要長度分佈在 300-325nm 之間 (圖三A)。前述分離所得病毒株經汁液摩擦接種於 8 科 28 種植物 (如表一) 並再回接於奎藜以測試有否感染並確認其寄主範圍，結果僅有紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* L.)、奎藜及綠藜 (*C. murale*) 三種藜科植物會被感染，顯現局部性病斑 (圖二)，其餘植物皆不罹病，由於無法確認無病毒朱槿健株，因此無法接種原寄主。具典型明顯黃脈嵌紋病徵之朱槿病葉經 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde) 前固



圖一、田間朱槿病毒病害病徵。(A) 黃脈嵌紋；(B、C、D) 葉脈黃化。

Fig. 1. Natural occurring symptoms of China rose viral disease. (A) vein yellowing mosaic ; (B、 C、 D) vein yellowing.



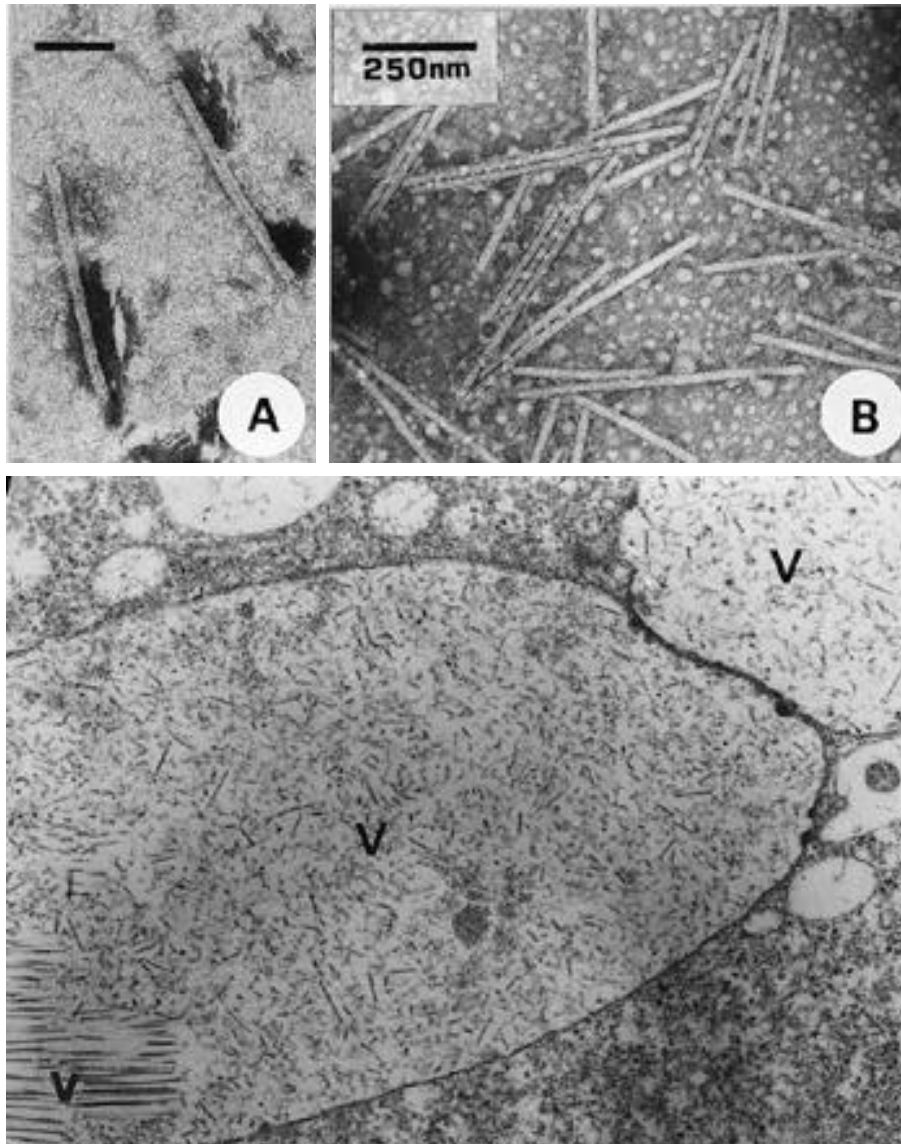
圖二、兩種藜科寄主植物機械接種朱槿黃脈嵌紋病毒 (暫定) 所產生之局部性病斑。(A) 紅藜褪綠斑；(B) 奎藜壞疽黃斑。
Fig. 2. Local lesions on leaves of two chenopodiaceous plants mechanically inoculated with hibiscus vein yellowing mosaic virus. (A) chlorotic spots on *Chenopodium amaranticolor*; (B) necrotic yellow spots on *C. quinoa*.

定後，再以 1% 四氧化鐵 (osmium tetroxide) 後固定，然後經 50-100% 酒精系列脫水，Spurr's resin 包埋，60-80nm 超薄切片，2% 醋酸鈉 (uranyl acetate) 與 0.4% 檸檬酸鉛 (lead citrate) 雙重染色等一系列處理後在電顯下觀察，發現細胞質中有明顯密集散佈之病毒粒子存在 (圖三 C)。純化病毒 (圖三B) 乃取 30 g 機械接種出現局部病斑之奎藜病葉參考 Gooding 與 Hebert 二氏之方法⁽⁹⁾ 進行純化。以上述純化所得病毒免疫注射紐西蘭白兔肌肉，連續 4 次注射後，採血所得之抗血清，以環形界面法 (ring interface precipitin test)⁽⁵⁾ 測試力價為 1024；經以瓊脂雙向擴散法 (SDS-agar gel double diffusion)⁽¹³⁾ 與其他直桿狀病毒抗血清比較測試結果顯示本研究病毒除與其同源抗體有明確正反應外，並不與 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 及 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) 二種台灣常見 *Tobamovirus* 屬病毒發生反應。

依據 2000 年國際病毒分類委員會 (ICTV) 正式記載及敘述，在田間自然感染朱槿或木槿屬 (*Hibiscus*) 甚至錦葵科 (Malvaceae) 植物之病毒並未發現有直桿狀 (rigid rod) 病毒⁽⁷⁾，然 Kashiwazaki *et al.*⁽¹⁰⁾ 卻曾於 1982 年報導在日本千葉縣神奈川植物園具葉片黃斑病徵之朱槿病株中分離到

一種直桿狀疑似 *Tobamovirus* 屬之 Hibiscus yellow mosaic virus (HYMV)，粒子大小為 300×18 nm，寄主範圍非常窄，僅能感染紅藜及矮牽牛 (*Petunia hybrida* Hort.) 引起局部性病斑，免疫電顯觀察並不與 TMV 抗血清發生反應，可在超薄切片病葉組織之細胞質及液胞中見到散佈之病毒粒子^(2,6)。而本研究中之朱槿田間病徵主要為黃脈嵌紋，與 Kashiwazaki *et al.*⁽¹⁰⁾ 在日本報導者明顯不同，病毒粒子雖皆為直桿狀，但主要長度分佈為 300-325 nm，顯然較 HYMV 稍長，寄主範圍雖亦如 HYMV 非常窄，但仍有所差異，並不感染矮牽牛，僅感染三種藜科植物，在病組織細胞質中亦有大量病毒粒子分佈。

依 2000 年 ICTV 分類，植物病毒粒子形態屬直桿狀者計有 *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Hordeivirus*, *Furovirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus* 及 *Benyvirus* 共 7 屬；其中除 *Tobamovirus* 外餘皆為多粒子性 (multipartite)⁽¹⁴⁾，就病毒粒子大小形態而言，本研究之病毒粒子為直桿狀，大小約 300-325 nm，與 *Tobamovirus* 屬特性最相符，因此暫將其列為 *Tobamovirus* 屬可能成員之一 (possible member)；由於日本所發現之 HYMV 目前資料非常有限，且並無 HYMV 抗體，而 HYMV 抗原又不可得，因此無法將本研



圖三、朱槿黃脈嵌紋病毒粒子及其罹病葉組織超薄切片電顯圖。(A) 歪藜病葉粗汁液中直桿狀病毒粒子。(橫線 = 100 nm)；(B) 純化病毒粒子；(C) 病毒粒子密集散佈於病組織細胞中。cw：細胞壁；v：病毒粒子。

Fig. 3. Electron micrographs of virus particles and ultrathin section of diseased leaf tissue of China rose. (A) rigid-rod particles of hibiscus vein yellowing mosaic virus (HVYMV) in *Chenopodium quinoa* prepared by leaf-dip method. Bar = 100 nm; (B) purified HVYMV particles; (C) densely scattered HVYMV particles in the infected cell of China rose. cw : cell wall, v : virus particles.

究中之病毒與 HYMV 作進一步比較；但基於此二病毒在粒子大小、寄主範圍、田間病徵、血清學反應僅有部分相同，因此建議目前暫時稱其為朱槿黃脈嵌紋病毒 (hibiscus vein yellowing mosaic virus, HVYMV)，至於本研究之病毒是否與日本報導之 HYMV 相同則有待將來進一步釐清。

謝辭

本研究所使用之 TMV 及 ORSV 抗血清與抗原承農委會農業試驗所張清安博士提供，謹此致謝。

引用文獻

1. 楊恭毅. 1984. Hibiscus (-162-173). P. 4114-4124. 楊氏園藝植物大名典 (第六冊). 中國花卉雜誌社. 台北. 7814 pp.
2. 與良清、齊藤康夫、土居養二、井上忠男、都丸散一. 1983. 植物病毒事典. 朝倉書店. 東京. P. 348-349.
3. 薛聰賢. 1995. 台灣花卉實用圖鑑 (第七輯). 薛氏園藝公司. 台北. P. 80-84.
4. 蔡雲鵬. 1991. 台灣植物病害名彙一修訂 3 版. 中華植保

表一、朱槿黃脈嵌紋病毒(暫定)汁液機械接種之寄主反應

Table 1. Reactions of test plants mechanically inoculated with hibiscus vein yellowing mosaic virus isolated from China rose

Test plant	Reaction ¹
Amaranthaceae	
<i>Gomphrena globosa</i>	-
Chenopodiaceae	
<i>Beta vulgaris</i>	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L
<i>Chenopodium murale</i>	L
<i>Chenopodium quinoa</i>	L
<i>Spinacia oleracea</i>	-
Compositae	
<i>Lactuca sativa</i>	-
Convolvulaceae	
<i>Ipomoea aquatica</i>	-
Cruciferae	
<i>Brassica rapa</i>	-
<i>Matthiola incana</i>	-
<i>Raphanus sativus</i>	-
Cucurbitaceae	
<i>Cucumis melo</i>	-
<i>Cucumis sativus</i>	-
<i>Cucurbita pepo</i>	-
<i>Luffa cylindrica</i>	-
<i>Momordica charantia</i>	-
Solanaceae	
<i>Capsicum frutescens</i>	-
<i>Datura stramonium</i>	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-
<i>Nicotiana debneyi</i>	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-
<i>Nicotiana repanda</i>	-
<i>Nicotiana rustica</i>	-
<i>Nicotiana sylvestris</i>	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	-
<i>Petunia hybrida</i>	-
<i>Solanum melongena</i>	-
Leguminosae	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-

¹. L : Local lesion ; - : No infection

學會/中華植病學會刊印. 604 pp.

- Ball, E. M. 1974. Serological Tests for Identification of Plant Viruses. The American Phytopathological Society, US, 31 pp.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., and Watson, L. 1996. Viruses of Plants. CABI, UK, 1484 pp.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. and Zurcher, E. J. (eds.) 1997. Viruses of Plants-Known susceptibilities of Malvaceae. in: Plant Viruses Online, Descriptions and Lists from the VIDE Database. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/Vide/> 16 pp.
- Brunt, A. A., and Spence, N. J. 2000. The natural occurrence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* (*Carmovirus; Tombusviridae*) in aibika or bele (*Abelmoschus manihot*) in some South Pacific Island countries. Plant Pathol. 49:798.
- Gooding, G. V., and Hebert, T. T. 1967. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large. Phytopathology 57:1285.
- Kashiwazaki, S., Yamashita, S., and Doi, Y. 1982. Two hibiscus viruses: hibiscus yellow mosaic virus and hibiscus chlorotic ringspot virus (in Japanese). Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 48:395.
- Lockhart, B. E. L. 1987. Evidence for identity of plant rhabdovirus causing vein yellowing diseases of tomato and *Hibiscus rosa-sinensis*. Plant Dis. 71: 731-733.
- MacFarlane, H. H. 1968. Plant Host-Pathogen Index to Volume 1-40 of Review of Applied Mycology. CAB, England, 820 pp.
- Purcifull, D. E., and Batchlor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. Fla. Agr. Exp. Sta. Bull. No. 788, 39 pp.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. 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. Academic Press, New York, 1162 pp.

ABSTRACT

Chen, T. H.^{1,2}, Kao, K. H.¹, Liou, M. R.¹, and Kao, C. L.¹ 2001. A unique tobamovirus-like virus isolated from vein yellowing mosaic China rose (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 10:195-200. (¹ Department of Plant Protection, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, R. O. C., ² Corresponding author, Email: thchen@mail.npust.edu.tw ; Fax : +886-8-7740293)

A previously unreported virus was isolated from leaves of China rose (*Hibiscus rosa-sinensis*) showing vein yellowing mosaic symptoms in Taiwan. The virus was readily transmitted by mechanical inoculation. It had a narrow host range restricted to three chenopodiaceous plants, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale* and *C. quinoa*. The virus was purified from *C. quinoa*, and rigid rod-shaped particles of 300-325 nm were observed in purified preparation and leaf dips of *H. rosa-sinensis*. Elongated virus particles were localized in the cytoplasm of infected China rose by ultrathin section electron microscopy. Antiserum with a titre of 1024 in the ring interface precipitin test was obtained with a purified virus from *C. quinoa*. The virus did not react with antisera to *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) in Ouchterlony test. These findings suggest the virus seems to be a member of *Tobamovirus*. A tentative name, hibiscus vein yellowing mosaic virus, was proposed.

Key words : *Hibiscus rosa-sinensis*, China rose, tobamovirus, hibiscus vein yellowing mosaic virus