

番茄斑萎病毒屬病毒之發生與快速偵測技術之新發展

葉錫東 曲芳華

臺中市 國立中興大學植物病理學系

聯絡作者：電子郵件sdyeh@nchu.edu.tw，傳真04-2852501

接受日期：中華民國88年10月30日

摘 要

葉錫東、曲芳華. 1999. 番茄斑萎病毒屬病毒之發生與快速偵測技術之新發展. 植病會刊8:125-132.

番茄斑萎病毒屬 (the genus *Tospovirus*) 為 *Bunyaviridae* 科中唯一可感染植物的屬，亦係目前唯一可經由薊馬類昆蟲以永續性方式傳播的植物病毒。*Tospovirus* 屬在臺灣的危害情形，以南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny) 所傳播造成西瓜及洋香瓜等葫蘆科植物嚴重損失的西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMV) 最具代表性。此外，台灣中部花生栽培區亦發現有 *Tospovirus* 屬的病毒引起的病害，由小黃薊馬 (*Scirtothrips dorsalis* Hood) 所媒介，此病毒後被命名為花生黃化扇斑病毒 (*Peanut chlorotic fan-spot virus*, PCFV)。番茄斑萎病毒屬成員，大多寄主範圍廣泛，且其病徵變異大，故不宜以寄主範圍及病徵作為各分離株之分類依據，血清類緣關係及核酸之序列分析，近年漸受重視。本研究室研發新的方法，可迅速自局部病斑寄主奎藜之葉片純化五種不同血清型的番茄斑萎病毒核鞘蛋白，且已進一步製備了高專一性的血清，包括多元抗體及單元抗體。此外，晚近西瓜銀斑病毒之三條基因體核酸序列亦已在本研究室全部解序完畢，是目前番茄斑萎病毒屬中第四個成員病毒，其基因體核酸全部解序完成者。另外，花生黃化扇斑病毒的基因體 S RNA 核酸序列亦已解序完畢。在核酸訊息已明朗化的情況下，各個不同血清型之廣效性及專一性核酸探針均經製備及成功應用，對田間番茄斑萎病毒屬病毒病害的快速檢測及其分類地位的確立有非常大的助益。

關鍵詞：番茄斑萎病毒屬、血清學特性、胺基酸相同度

一、緒言

1915年在澳洲首先發現斑點萎凋 (spotted wilt) 病徵之番茄⁽³⁾。1930年，此病害被證實由病毒所引起，並定名為番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)⁽³⁷⁾。爾後，TSWV在其它許多地區陸續被發現，為一世界性之病毒，廣泛分佈於熱帶、亞熱帶及溫帶地區⁽³³⁾，其寄主包含單子葉及雙子葉植物，目前已有記載的達 82科800多種植物⁽³²⁾，一般常見的重要經濟作物，如煙草、番茄、西瓜、花生、萵苣、菊花，都會因此病毒感染而遭受嚴重的損失^(20, 27, 29, 33)。主要病徵為寄主植物產生斑點 (spot)、黃化 (chlorosis)、斑駁 (mottling)、矮化 (stunting)、萎凋 (wilting) 甚至嚴重壞疽 (necrosis)，且病徵之表現會隨環境因子、植物生長狀況或株齡而異。基於此類病毒之廣泛寄主範圍、薊馬傳播之特性及具有獨特之粒子型態，於1970年被單獨分類為番茄斑萎病毒群 (tomato spotted wilt virus group)，並於1991年經國際病毒命名委員會 (International Committee on Taxonomy of Virus, ICTV) 討論後，正式改稱為番茄斑萎病毒屬 *Tospovirus*，列為 *Bunyaviridae* 科之一

屬，且以番茄斑萎病毒 TSWV 為其典型代表^(13, 16)。

Bunyaviridae 科之病毒以節肢動物 (arthropods) 傳播媒介，而番茄斑萎病毒屬 *Tospovirus* 為 *Bunyaviridae* 科中唯一可感染植物的一個屬⁽³⁶⁾，且是目前所有植物病毒中唯一可被薊馬類昆蟲以永續性方式傳播的病毒。薊馬在幼蟲期 (larval stages) 獲毒，獲毒後經過一段時間便可傳播此病毒，潛伏期長短不一，獲毒的幼蟲到成蟲期後仍有傳播的能力，目前已知有七種薊馬可傳播番茄斑萎病毒屬病毒⁽³¹⁾。病毒在經長期的機械接種情況下，常容易失去被薊馬傳播的性狀⁽⁴⁴⁾。

番茄斑萎病毒屬病毒為一球型病毒，直徑約在 80-110 nm之間⁽⁴²⁾。此病毒具有一脂質蛋白套膜 (lipoprotein envelope)，在病毒粒子中有三條線狀單股 RNA 分子，依分子量大小而命名為 L RNA (約9 kb)、M RNA (約5 kb) 及 S RNA (3-3.5 kb)⁽¹⁷⁾。三條 RNA 分別與核鞘蛋白 (nucleocapsid protein, NP) 緊密包裹形成一假環狀構造 (pseudo-circular structure)⁽²⁸⁾。其基因體表現方式包括有負極性及雙極性對應蛋白之策略 (negative sense and

ambisense coding strategies)⁽¹⁷⁾。病毒粒子內的三條RNA共可轉譯出六種蛋白，分別為核鞘蛋白 (N protein)、G1及G2醣蛋白 (G1/G2 glycoproteins)、病毒RNA複製酵素 (L protein)、及兩種非結構性NSm和NSs蛋白 (NSm and NSs proteins)。L RNA為負極性，其互補股對應產生一大分子之蛋白 (L protein)，應為複製酵素。M及S RNAs為雙極性。病毒股M RNA對應產生NSm蛋白，與病毒RNA在植物細胞與細胞間的移動有關，可能是病毒的移動蛋白 (movement protein)⁽²³⁾，而其互補股對應產生 G1/G2 蛋白，是G1及G2醣蛋白的先驅蛋白，此二蛋白在病毒的套膜上形成突起 (spikes)。S RNA病毒股對應產生NSs蛋白，功能目前尚不清楚，但已知可在感病細胞內形成絲狀體⁽²²⁾；其互補股則對應產生核鞘蛋白 (NP)。

二、病毒在植物體的感染過程

在自然界，番茄斑萎病毒屬是藉由帶毒的薊馬取食，進入植物細胞造成感染，而在實驗室的條件下，則以金剛砂進行機械接種造成植物葉片組織受到輕微的傷害而感染。整個病毒感染植物的模式乃由 Prins and Goldbach 在 1998年⁽³²⁾ 提出，病毒進入植物細胞首先釋放它的套膜，然後具感染力的核鞘蛋白RNA便進到細胞質中，在這個階段，病毒RNA會進行轉錄或複製。依據其他負極性病毒相似的感染過程中觀察到，由轉錄變成複製的樞紐是由細胞質中游離的核鞘蛋白濃度所控制，在低濃度時，感染過程開始起動，複製酵素進行mRNA的生產，經轉譯後，產生不同的病毒蛋白，待核鞘蛋白的濃度提高後，複製酵素便轉至進行病毒基因體 RNA的複製作用，而完成複製的程序。至於在細胞質中所觀察到大量平行排列的結晶狀物係由NSs蛋白組成⁽²²⁾，目前則對其形成的目的及功能未知。然而，形成醣蛋白的先驅物則擁有一段訊息序列可使轉譯工作在粗糙內質網 (rough endoplasmia reticulum, RER) 中進行，經過醣化作用及裂解過程後，醣蛋白便移至粗糙內質網出芽 (budding) 的位置。經L蛋白 (複製酵素) 複製的病毒基因體RNA，便與核鞘蛋白連結，再經由 NSm蛋白連結便可經由管狀的結構轉移至鄰近的細胞^(23, 41)。另外，核鞘蛋白包被的RNA構造與醣蛋白結合，經由高爾基體膜出芽形成新的病毒顆粒，新生成的病毒顆粒可藉由薊馬的取食而於薊馬體內潛伏複製，再傳播至其他植物。

三、病毒之血清群分類

由於番茄斑萎病毒屬病毒有許多分離株，且其寄主範圍廣泛，以病徵及寄主範圍來作為分類的依據容易出現混淆，因此利用血清類緣關係及核酸序列分析便成為重要的分類依據。番茄斑萎病毒屬病毒在生體外不穩定，在室溫下其活性僅可維持 2-4小時，最高致死溫度為 40-50⁽²⁰⁾，又具有套膜，純化十分困難，在純化過程中無法去除

的寄主成份，使製備的抗血清專一性不佳。不過近來由於酵素連結免疫分析 (ELISA) 與西方轉漬法 (western blotting) 之改進及單元抗體 (monoclonal antibody) 生產技術之採用，加上純化方法的改良，使得番茄斑萎病毒屬病毒分離株間的血清關係得以明朗化。第三屆 *Tospovirus* 屬國際病毒研討會議於 1995年在臺灣農業試驗所舉行，依核鞘蛋白的血清關係將 *Tospovirus* 屬病毒分為四個血清群^(1, 10, 19, 45, 48)，番茄斑萎病毒 TSWV 分離株屬於第一血清群 (serogroup I)，與第三、第四血清群皆無血清關係，但與第二血清群有相互微弱的反應。第二血清群的成員包括花生輪點病毒 (*Groundnut ringspot virus*, GRSV)，番茄黃化斑點病毒 (*Tomato chlorotic spot virus*, TCSV) 均與第一群的 TSWV 具微弱血清關係，但核鞘蛋白核殼酸相同度只有 77% 左右⁽⁹⁾。第三血清群的代表是感染鳳仙花的鳳仙花痘斑病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV)，於 1990 年由 Law 等人發表⁽²⁵⁾，與 TSWV 之核鞘蛋白無血清關係，不過 G1 及 G2 蛋白仍有關係。第四血清群以西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMV) 為代表⁽⁴⁸⁾，其成員還包括花生頂芽壞疽病毒 (*Peanut bud necrosis virus*, PBNV)⁽³⁹⁾，兩者之間有血清關係，但均與第一、二、三型無任何血清關係。然而 1998年 5月於荷蘭 Wageningen 農業大學召開的第四屆 *Tospovirus* 屬國際病毒研討會議中，此病毒屬則擴充至十個血清群，包括 13 個病毒種 (species)，新增的 WBNV (*Watermelon bud necrosis virus*)⁽²¹⁾ 與先前的 WSMV 及 PBNV 具有血清學關係，列為第四血清群，其他 PYSV (*Peanut yellow spot virus*)⁽³⁸⁾，IYSV (*Iris yellow spot virus*)⁽⁷⁾，PSMV (*Physalis severe mottle virus*)⁽⁸⁾，CSNV (*Chrysanthemum stem necrosis virus*)⁽¹¹⁾，ZLCV (*Zucchini lethal chlorosis virus*)⁽¹¹⁾，及 PCFV (*Peanut chlorotic fan-spot virus*)⁽⁵⁰⁾ 則與其他病毒無血清上的關係，各自獨立形成新的血清群，分別列在第五至第十血清型 (表一)。

四、病毒基因體核酸之分類

除了核鞘蛋白的血清關係外，核酸序列分析也是番茄斑萎病毒屬病毒的一個重要分類依據。目前 TSWV、INSV、WSMV 及 PBNV 之三個基因體核酸 L、M、S RNAs 皆已被解序完成。TSWV 的 L RNA 有 8897 個核殼酸⁽¹⁵⁾，具有一個轉譯架構 (open reading frame, ORF)，為負極性 (negative polarity)，對應產生一個 331.5 kDa 的蛋白分子，具有 RNA 複製酵素的特性。INSV 的 L RNA，共有 8876 個核殼酸，對應產生一個 330.3 kDa 的蛋白⁽⁴³⁾。和 TSWV 比較，兩者的胺基酸序列有 69.5% 的相同度。PBNV 的 L RNA 有 8911 個核殼酸，對應產生一個 330 kDa 的蛋白⁽¹⁸⁾。WSMV 的 L RNA 則有 8917 個核殼酸，對應產生 331.8 kDa 的蛋白，與同血清型的 PBNV 相較有 91.3% 的胺基酸相同

表一、番茄斑萎病毒屬核鞘蛋白基因之胺基酸序列相同度
Table 1. Amino-acid sequence identities (%) of the N genes of tospoviruses.

| Serogroup | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | | | |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Virus | TSWV | TCSV | GRSV | INSV | WSMV | PBNV | WBNV | PYSV | IYSV | PSMV | CSNV | ZLCV | PCFV |
| TSWV | 100 | 77 | 78 | 55 | 33 | 33 | 32 | 26 | 34 | 29 | 77 | 73 | 19 |
| TCSV | | 100 | 81 | 55 | 26 | 33 | 31 | 23 | 34 | 29 | 75 | 73 | 22 |
| GRSV | | | 100 | 54 | 33 | 34 | 33 | 22 | 33 | 29 | 75 | 75 | 23 |
| INSV | | | | 100 | 30 | 30 | 29 | 23 | 30 | 28 | 58 | 52 | 22 |
| WSMV | | | | | 100 | 86 | 85 | 24 | 44 | 57 | 33 | 32 | 22 |
| PBNV | | | | | | 100 | 85 | 23 | 44 | 57 | 32 | 31 | 24 |
| WBNV | | | | | | | 100 | 22 | 43 | 58 | 32 | 30 | 21 |
| PYSV | | | | | | | | 100 | 21 | 23 | 25 | 20 | 66 |
| IYSV | | | | | | | | | 100 | 49 | 35 | 32 | 27 |
| PSMV | | | | | | | | | | 100 | 34 | 29 | 22 |
| CSNV | | | | | | | | | | | 100 | 82 | 22 |
| ZLCV | | | | | | | | | | | | 100 | 21 |
| PCFV | | | | | | | | | | | | | 100 |

Data from the Fourth International Symposium on Tospoviruses and Thrips in Floral and Vegetable Crops (Wageningen, The Netherlands, May 2-6, 1998, communicated by Dr. R. Kormelink). TSWV: *Tomato spotted wilt virus* (Australia, USA, The Netherlands), TCSV: *Tomato chlorotic spot virus* (Brazil), GRSV: *Groundnut ringspot virus* (South Africa), INSV: *Impatiens necrotic spot virus* (USA, Europe), WSMV: *Watermelon silver mottle virus* (Taiwan, Japan), PBNV: *Peanut bud necrosis virus* (India), WBNV: *Watermelon bud necrosis virus* (India), IYSV: *Iris yellow spot virus* (The Netherlands), PSMV: *Physalis severe mottle virus* (Taiwan), CNSV: *Chrysanthemum stem necrosis virus* (Brazil), ZLCV: *Zucchini lethal chlorosis virus* (Brazil), PCFV: *Peanut chlorotic fan-spot virus* (Taiwan)

度，與不同血清型的TSWV及INSV則有44.3%和46.5%的胺基酸相同度(曲及葉，未發表結果)。

目前TSWV、INSV、WSMV、PBNV的M RNA都已經解序完成。TSWV有4821個核殼酸⁽²⁴⁾，INSV有4972個⁽²⁶⁾，WSMV有4880個⁽⁶⁾，PBNV有4801個⁽⁴⁰⁾。M RNA具有雙極性對應策略(ambisense coding strategy)，有兩個ORFs，病毒股(viral sense strand) RNA對應產生一個大約34 kDa的非結構性蛋白(NSm)(TSWV:33.6 kDa, INSV:34.1 kDa, WSMV:35 kDa, PBNV:34 kDa)，病毒互補股(viral complementary strand)則產生一個約130 kDa的大蛋白(TSWV:127.4 kDa, INSV:124.9 kDa, WSMV:127.6 kDa, PBNV:127.6 kDa)，此蛋白為G1、G2蛋白的前驅物。*Tospovirus*屬M RNA的雙極性特性是Bunyaviridae科其他屬病毒所沒有的，其他不感染植物的Bunyaviridae科之M RNA皆為負極性。在TSWV及INSV的G1/G2蛋白中可發現一個RGD序列，此序列推測與細胞吸附有關⁽³⁵⁾，但在WSMV及PBNV的M RNA所產生的G1/G2蛋白則並無此序列的存在^(6,40)。

至於S RNA方面，第四屆Tospovirus屬國際病毒研討會議中，共有13個病毒種，已將核鞘蛋白基因解序完畢(表一)。第一血清群之TSWV的S RNA具有2916核殼酸，為雙極性的RNA。其可對應產生兩種蛋白，一為由病毒股RNA對應產生52.4 kDa的非結構性蛋白(NSs protein)，另一個為由互補股RNA所對應產生28.8 kDa的核鞘蛋白⁽¹³⁾。

第二血清群的GRSV及TCSV目前已見發表者僅核鞘蛋白及3'端的核酸序列，其他部份仍付闕如⁽⁹⁾。1993年，Pang等人曾發表一個由巴西分離出的TSWV分離株，命名為TSWV-B，所含S RNA有3049個核殼酸，其核鞘蛋白基因與TSWV只有77.5%的核酸相同度及79.1%的胺基酸相同度，與INSV有63.1%及55.3%的核酸及胺基酸相同度，與de Avila發表的GRSV與TCSV比較有94.4%及81.5%的胺基酸相同度⁽³⁰⁾，此結果顯示其與第二血清群的GRSV相近，此分離株應屬於GRSV。第三血清群的INSV，目前已知S RNA有2992個核殼酸，其5'端的核酸序列仍不完全，其核鞘蛋白與TSWV只有67%的相似度，NSs蛋白也只有51.9%⁽¹⁴⁾。第四血清群的WSMV具有3534個核殼酸，同樣也是雙極性RNA，可對應產生275個氨基酸的核鞘蛋白及439個胺基酸的NSs蛋白。WSMV S RNA的核殼酸長度較TSWV及INSV分別長618及542個核殼酸，主要原因是WSMV的S RNA在兩基因間的非轉譯區有1261個核殼酸，比起TSWV及INSV長了752及613個核殼酸⁽⁵¹⁾。PBNV的S RNA有3057個核殼酸，亦具有兩個轉譯架構，可產生一個49.5 kDa的NSs蛋白及30.6 kDa的核鞘蛋白⁽³⁹⁾，其中核鞘蛋白的胺基酸跟WSMV有86%的相同度。另外，WBNV的核鞘蛋白有275個胺基酸，比其他血清群的病毒長1329個胺基酸，其核鞘蛋白的胺基酸跟WSMV及PBNV有7981%的相同度，與其他血清群則只有4446%的胺基酸相同度⁽²¹⁾。因此WSMV，PBNV及WBNV同屬於第四血清

群，但為不同種的病毒。獨立於以上四種血清群的 PYSV 其 S RNA 具有 2970 個核鹼酸，其病毒股 RNA 可對映產生一個 53.2 kDa 的 NSs 蛋白，病毒互補股 RNA 可對映產生一個 28.0 kDa 的 N 蛋白與其他血清群只有 22-26% 的胺基酸相同度，此外 PYSV 的 S RNA 的互補股上具有其它血清群所沒有的第三個轉譯架構，估計可對應產生約 7.5 kDa 的蛋白⁽³⁸⁾。至於 IYSV 的 S RNA 有 3105 個核鹼酸⁽⁷⁾，具有兩個轉譯架構，可產生一個 50.1 kDa 的 NSs protein 及 30.5 kDa 的核鞘蛋白，核鞘蛋白與第四種血清群有 44% 的胺基酸相同度，其他皆偏低。PSMV 與 IYSV 類似，與第四種血清群有較高約 58% 的核鞘蛋白相同度。CSNV 與 ZLCV 相近，有 82% 的核鞘蛋白相同度，且與第一和二種血清群有 75-77% 的核鞘蛋白相同度。至於 PCFV 則與 PYSV 較接近有 66% 的核鞘蛋白相同度，而與其他番茄斑萎病毒屬病毒僅有 19-27% 的相同度。

雙極性的 S 及 M RNA 中均具有一富含 A-U 的核酸序列，此區域位在兩個 ORF 之間，可形成一髮夾狀構造，目前推測其可能跟轉錄終止有關。至於基因體的 5' 及 3' 非轉譯區則可互相配對形成一鍋柄狀的構造 (panhandle structure)，使 RNA 形成一假環狀構造 (pseudo-circular structure)，這種鍋柄狀的構造可能是病毒的一種轉錄及複製的辨識構造⁽¹⁷⁾。比較目前已發表的番茄斑萎病毒屬病毒 S RNA，發現其病毒股的 3' 端末有 8 個核鹼酸是相同的 (5'-AUUGCUCU-3')，再比較已解出整個基因體 L、M 及 S RNA 的 TSWV、INSV、WSMV 及 PBNV，也可發現到在 L 及 M 病毒股的 3' 端末亦具有同樣的核酸序列，此核酸序列對 *Tospovirus* 屬而言是一個非常重要的分類特徵⁽¹²⁾。在 *Bunyaviridae* 這一科的分類特性裡，各屬中的不同病毒分離株其基因體病毒股 RNA 之 3' 端至少有 8 個核鹼酸序列相同，但各屬間此種保留序列均不相同⁽²⁹⁾。

五、西瓜銀斑病毒在臺灣之發生及其特性

西瓜銀斑病毒 WSMV 首先由 1988 年葉氏等⁽⁴⁹⁾ 由田間西瓜及溫室的刺角瓜中分離出。1990 年，陳氏等報告此病毒所引起之病害已成為彰化、雲林沿海西瓜栽培一大障礙，並證實所分離之病毒係由南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny) 所傳播。近年來，東海岸及屏東若干西瓜栽培區，因 WSMV 感染蒙受嚴重損失。田間西瓜病株出現節間縮短，植株矮化，幼葉斑駁、皺縮，末稍直立、萎縮、壞疽、焦枯，果實脫落或縮小畸形，並伴隨壞疽斑點或銀色斑駁病徵⁽⁴⁹⁾。此外近年嘉義，台南之洋香瓜產地亦受此病毒侵襲，損失慘重，WSMV 已成為本省瓜類之首要殺手，並為本省夏季西瓜及洋香瓜生產之最重要限制因子。本實驗室晚近亦證實由冬瓜⁽⁴⁾、甜瓜、蒟蒻等所分離之病毒亦均屬於此類之病毒。可以預見此病毒在本省蔬果栽培區分布廣泛，夏季高溫季節，在薊馬蟲口密度高的情況

下，將成為瓜類生產之棘手問題。

葉氏等⁽⁴⁹⁾ 在彰化大城西瓜栽培區分離所得之西瓜分離株，其特點主要是可系統性危害葫蘆科 (*Cucurbitaceae*) 植物及媒介昆蟲為南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny)。其核鞘蛋白血清性狀與血清型 I 的番茄斑萎病毒 TSWV、血清型 II 的花生輪斑病毒 GRSV、番茄黃斑病毒 TCSV 及血清型 III 的鳳仙花痘斑病毒 INSV，並無血清學的關係，故被列為血清型 IV⁽⁴⁶⁾。

台灣之 WSMV 西瓜分離株⁽⁴⁶⁾、台灣之 WSMV 番茄分離株 (Tospo-To)⁽²⁾、日本的 WSMV 西瓜分離株⁽²⁰⁾、印度的花生分離株 PBNV⁽³⁴⁾ 及印度的西瓜分離株 WBNV⁽²¹⁾ 間，有血清關係，屬於同一血清型，顯然亞洲地區之番茄斑萎病毒屬病毒有別於歐洲及美洲大陸，自成一血清群。

在核酸層次方面，晚近其三條基因體核酸序列亦已被本研究室全部解序完畢，目前是 *Tospovirus* 屬中第四個病毒基因體核酸全部解序完畢者，WSMV 的 S RNA 全長有 3534 個核酸，其核鞘蛋白基因與其它已發表之不同血清型的番茄斑萎病毒屬病毒比對，有 22-57% 的相同度^(47, 51)；而 M RNA 全長有 4880 個核酸，其 NSm 及 G1/G2 蛋白，與 TSWV 及 INSV 比對，僅有 31-41% 的相同度⁽⁶⁾；至於 L RNA 全長有 8917 個核酸，其對應產生的複製酵素與 TSWV 及 INSV 比對，則僅有 22-47% 的相同度 (unpublished data)，且三條基因體核酸在 3' 端皆有 5'-AUUGCUCU-3' 的序列，從遺傳分子的分析結果顯示，確實證明西瓜銀斑病毒 WSMV 為 *Tospovirus* 屬中之獨立的一個種。由於本研究室已解出 WSMV 所有遺傳訊息，未來對於病毒的診斷及防治則可輕易從核酸層次上著手。

六、花生黃化扇斑病毒在臺灣之發生及其特性

1992 年，陳氏於嘉義鹿草、彰化秀水等地發現少數花生葉片有輪紋之病徵，在電顯下觀察可發現類似番茄斑萎病毒屬病毒之粒子，接種於奎黎可發現有輪紋病斑，而後證實其媒介昆蟲為小黃薊馬 (*Scirtothrips dorsalis* Hood)，此病毒後被命名為花生黃化扇斑病毒 (*Peanut chlorotic fan-spot virus*, PCFV)⁽⁵⁾。其核鞘蛋白血清性狀與血清型 I 的番茄斑萎病毒 TSWV、血清型 II 的花生輪斑病毒 GRSV、血清型 III 的鳳仙花痘斑病毒 TCSV 及血清型 IV 的西瓜銀斑病毒 WSMV，並無血清學的關係⁽⁴⁸⁾，因此其核鞘蛋白血清性狀於 1998 年第四屆 *Tospovirus* 屬國際病毒研討會議中被列為第十血清型。目前其基因體 S RNA 核酸序列，亦已由本研究室解序完畢，全長 2833 個核鹼酸，包含有兩個轉譯架構、中央非轉譯區及 5' 和 3' 非轉譯區。其中非結構性蛋白 (NSs) 基因位在病毒股上，對應產生 51.5 kDa 的蛋白，與其他已發表之番茄斑萎病毒屬的病毒相較，其胺基酸的相同度有 19.3-54.2%。而 PCFV 的核鞘蛋白基因位在病毒的互補股上，對應產生一個 31.1 kDa 的蛋

白，與其他已發表之番茄斑萎病毒屬的病毒相較，有 22.3 67.5% 的胺基酸相同度。此外在其基因體核酸的 3' 端亦具有 5'-AUUGCUCU-3' 的序列 (unpublished data)。因此從遺傳分子的結果顯示，證實 PCFV 是 *Tospovirus* 屬中之一新種。

七、快速偵測技術之最新發展

番茄斑萎病毒屬病毒在全球許多重要經濟作物及花卉上造成重大損失，為防治此病毒屬之病毒，不同番茄斑萎病毒屬病毒之快速簡易偵測鑑定系統的建立實為當前要務。近年來，本研究室研發新的方法，利用單斑寄主奎黎大量繁殖病毒，可迅速純化五個不同血清型病毒的核鞘蛋白，包括有番茄斑萎病毒 TSWV、花生輪斑病毒 GRSV、鳳仙花痘斑病毒 INSV、西瓜銀斑病毒 WSMV 和花生黃化扇斑病毒 PCFV，並進而製備高專一性的核鞘蛋白抗血清。在經過免疫擴散反應、酵素聯結血清反應及西方轉漬法等分析的結果發現，花生黃化扇斑病毒 PCFV 的核鞘蛋白與其他番茄斑萎病毒屬病毒血清型 I-IV 皆無反應，亦即除了血清型 I 的番茄斑萎病毒 TSWV 和血清型 II 的花生輪斑病毒 GRSV 有微弱的血清學交互反應外，其餘均只與本身同源之抗原產生反應，彼此間不反應，且不與健康植株起非專一性反應。顯示花生黃化扇斑病毒 PCFV 與各個血清型彼此間並無血清學上的關係。除此之外，晚近由美國農部徐惠迪博士協助指導下，本研究室更進一步完成了番茄斑萎病毒 TSWV、鳳仙花痘斑病毒 INSV、西瓜銀斑病毒 WSMV 及花生黃化扇斑病毒 PCFV 四種血清型之單元抗體的製備，因此這些血清將為國內及國際間番茄斑萎病毒屬病毒之診斷鑑定提供完整之良好工具。

另外，在核酸訊息已明朗化的情況下，目前更著手進行各個不同血清型專一性及廣效性核酸探針之製備。除了利用核鞘蛋白基因作為探針，可檢測不同血清型的病毒之外，晚近本實驗室亦利用番茄斑萎病毒屬病毒 L RNA 具有高度的相似度之特性，設計出簡併性引子 (degenerate primers)，已可成功地廣泛應用在番茄斑萎病毒 TSWV、花生輪斑病毒 GRSV、鳳仙花痘斑病毒 INSV、西瓜銀斑病毒 WSMV 及花生黃化扇斑病毒 PCFV 五個不同血清型的病毒進行檢測，除了本身番茄斑萎病毒屬的病毒可檢測外，與其他的病毒屬，如較相近的 *Tenuivirus* 及較疏遠的 *Tobamovirus*、*Potexvirus*、*Potyvirus*、*Nepovirus* 及 *Cucumovirus* 屬之病毒並不會反應，顯示此簡併性引子對番茄斑萎病毒屬具有高度的專一性。如此對於田間番茄斑萎病毒屬病毒病害的快速檢測及其分類地位的確立有非常大的助益。此外，本研究室目前已構築番茄斑萎病毒 TSWV、花生輪斑病毒 GRSV、鳳仙花痘斑病毒 INSV 及西瓜銀斑病毒 WSMV 之核鞘蛋白基因之轉基因煙草，期能得到分別對番茄斑萎病毒屬四個血清群病毒具專一性抗性之轉基因煙草，可作為生物分析鑑定病毒之用，以提供另一

個簡便迅速的生物檢定系統。

八、結論

番茄斑萎病毒屬病毒廣泛分布於熱帶、亞熱帶及溫帶地區，在許多重要的經濟作物及花卉上造成重大的損失。目前番茄斑萎病毒屬病毒已擴充至十個血清型，確定的病毒種有 13 種之多，其中西瓜銀斑病毒 WSMV 及花生黃化扇斑病毒 PCFV 就發生在台灣，另外 *Physalis severe mottle virus* (PSMV) 亦源自台灣⁽⁸⁾，由此可知，番茄斑萎病毒屬的族群分布在台灣具有相當高的比例，顯示台灣可為世界上研究此屬病毒的重鎮。番茄斑萎病毒屬寄主範圍廣泛且病徵差異大，不易以寄主範圍及病徵作為各分離株之分類依據。所以，目前以血清類緣關係及核酸序列分析為重要依據。目前本研究室已製備有五種血清型之多元抗體及四種血清型之單元抗體，這些血清將為國內及國際間番茄斑萎病毒屬病毒之診斷鑑定提供完整之良好工具。此外，晚近西瓜銀斑病毒之三條基因體核酸序列已被本研究室全部解序完畢，目前是番茄斑萎病毒屬中第四個病毒基因體核酸全部解序完畢者，另外花生黃化扇斑病毒基因體 S RNA 核酸序列亦已解序完畢，因此在獲得了核酸的資訊下，目前所著手製備的核酸探針及簡併性引子對，未來對於田間番茄斑萎病毒屬病毒病害的快速檢測及其分類地位的確立將有非常大的助益。

謝 辭

本研究室有關番茄斑萎病毒屬病毒之研究常年來蒙國科會及農委會中美計劃之支助，特此誌謝。

引用文獻

1. Adam, G., Lesemann, D. E., and Vetter, H. J. 1991. Monoclonal antibodies against tomato spotted wilt virus: characterization and application. *Ann. Appl. Biol.* 118:87-104.
2. Adam, G., Yeh, S. D., Reddy, D. V. R., and Green, S. K. 1993. Serological comparison of tospovirus isolates from Taiwan and India with impatiens necrotic spot virus and serogroup of tomato spotted wilt virus. *Arch. Virol.* 130:237-250.
3. Brittlebank, C. C. 1919. Tomato disease. *J. Agric. Victoria.* 17:213-235.
4. Chen, C. C., Ho, H. M., Chang, T. F., Chao, C. H., and Yeh, S. D. 1995. Characterization of a tospovirus-like virus isolated from wax gourd. *Plant Prot. Bull.* 37:117-131.
5. Chen, C. C., and Chiu, R. J. 1996. A tospovirus infecting

- peanut in Taiwan. *Acta Horticult.* 431:57-67.
6. Chu, F. H., and Yeh, S. D. 1998. Comparison of replication forms and ambisense M RNA of watermelon silver mottle virus with other tospoviruses. *Phytopathology* 88:351-358.
 7. Cortes, I., Livieratos, I. C., Derks, A., Peters, D., and Kormelink, R. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology* 88:1276-1282.
 8. Cortes, I., Pereira, A., Goldbach, R., Peters, D., and Kormelink, R. 1998. An RT-PCR procedure to amplify S RNA sequences of distinct tospoviruses. In: *Recent progress in Tospovirus and thrips research*. Edited by Peters, D., and Goldbach, R., Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. P35-37 (abstract).
 9. de Avila, A. C., de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., Goidbach, R., and Peters, D. 1993. Classification of tospovirus based on phylogeny of nucleoprotein gene sequence. *J. Gen. Virol.* 74:153-159.
 10. de Avila, A. C., Huguenot, C., de Oliveira Resende, R., Kitajima, E. W., Goldbach, R., and Peters, D. 1990. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 71:2801-2827.
 11. de Avila, A., Pozzer, L., Bezerra, I., Kormwlink, R., Prins, M., Peters, D., Nagata, T., Kitajima, E., and Resende, R. 1998. Diversity of tospoviruses in Brazil. In: *Recent progress in Tospovirus and thrips research*. Edited by Peters, D., and Goldbach, R., Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. P32-34 (abstract).
 12. de Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D., and Goldbach, R. 1989. Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNAs of tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 70:3469-3473.
 13. de Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D., and Goldbach, R. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* 71:1001-1007.
 14. de Haan, P., Avila, A. C., Kormelink, R., Westerbroek, A., Gielen, J. J. L., Peters, D., and Goldbach, R. 1992. The nucleotide sequence of the S RNA of impatiens necrotic spot virus, a novel tospovirus. *FEBS Letters* 306:27-32.
 15. de Haan, P., Kormelink, R., de O. Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D., and Goldbach, R. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 71:2207-2216.
 16. Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., and Brown, F. 1991. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2.
 17. German, T. L., Ullman, D. E., and Moyer, J. W. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30:315-348.
 18. Gowda, S., Satyanarayana, T., Naidu, R. A., Mushegian, A., Dawson, W. O., and Reddy, D. V. R. 1998. Characterization of the large (L) RNA of peanut bud necrosis tospovirus. *Arch. Virol.* 143:2381-2390.
 19. Gonsalves, D., and Trujillo, E. E. 1986. Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus by ELISA. *Plant Dis.* 70:501-506.
 20. Iwaki, M., Honda, T., Hanada, K., Tochihara, H., Yonaha, T., Hokama, K., and Yokoyama, T. 1984. Silver mottle disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Dis.* 68:1006-1008.
 21. Jain, R. K., Pappu, R. H., Pappu, S. S., Krishna Reddy, M., and Vani, A. 1998. Watermelon bud necrosis tospovirus is a distinct virus species belonging to serogroup IV. *Arch. Virol.* 143:1637-1644.
 22. Kormelink, R., Kitajima, B. W., de Haan, P., Zuidema, D., Peters, D., and Goldbach, R. 1991. The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology* 181:459-468.
 23. Kormelink, R., Storms, M., van Lent, J., Peters, D., and Goldbach, R. 1994. Expression and subcellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* 200:56-65.
 24. Kormeniink, R., de Haan, P., Meurs, C., Peters, D., and Goldbach, R. 1992. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segment. *J. Gen. Virol.* 73:2795-2804.
 25. Law, M. D., and Moyer, J. W. 1990. A tomato spotted wilt like virus with a serologically distinct N protein. *J. Gen. Virol.* 71:933-938.
 26. Law, M. D., Speck, J., and Moyer, J. W. 1992. The M RNA of impatiens necrotic spot tospovirus (*Bunyaviridae*) has an ambisense genomic organization. *Virology* 188:732-741.
 27. Matthews, R. B. F. 1991. *Plant virology* (3rd ed.). 835 pages, Academic Press, New York.
 28. Mohamed, N. A. 1981. Isolation and characterization of subviral structures from tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 53:197-208.

29. Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ohabruhal., S. A., Jarvis, A. W., Martelli, O. P., Mayo, M. A., and Summers, M.D. 1995. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Arch. Virol. Suppl. 10.
30. Pang, S. Z., Slightom, J. L., and Gonsalves, D. 1993. The biological properties of a distinct tospovirus and sequence analysis of its S RNA. Phytopathology 83:728-733.
31. Peters, D., Wijkamp, L., van de Wetering, F., and Goldbach, R. 1996. Vector relations in the transmission and epidemiology of tospoviruses. Acta. Horticult. 431:29-42.
32. Prins, M., and Goldbach, R. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. Tren. Microbiol. 6:31-35.
33. Reddy, D. V. R., and Wightman, J. A. 1988. Tomato spotted wilt virus: Thrips transmission and control. Adv. Dis. Vector Res. 5:203-220.
34. Reddy, D. V. R., Ratna, A. S., Sudarshana, M. R., Poul, F., and Kiran Kumar, I. 1992. Serological relationships and purification of bud necrosis virus, a tospovirus occurring in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in India. Ann. Appl. Biol. 120:279-286.
35. Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. 1986. Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal. Cell 44:517-518.
36. Sakimura., K. 1962. The present status of thrips-borne disease, in Maramorocsh. K. (ed): Biological transmission of disease agents. New York and London, Academic Press, p33-40.
37. Samule, G., Bald, J. G., and Pittman, H. A. 1930. Investigations on "spotted wilt" of tomatoes. Australia Commonwealth Coun. Sci. Ind. Res. Org. Bull. 44:1-64.
38. Satyanarayana, T., Gowda, S., Lakshminarayana Reddy, K., Mitchell, S. E., Dawson, W. O., and Reddy, D. V. R. 1998. Peanut yellow spot virus is a member of a new serogroup of *Tospovirus* genus based on small (S) RNA sequence and organization. Arch. Virol. 143:353-364.
39. Satyanarayana, T., Mitchell, S. B., Reddy, D. V. R., Brown, S., Kresovich, S., Jarret, R., Naidu, R. A., and Demski, J. W. 1996. Peanut bud necrosis tospovirus S RNA: Complete nucleotide sequence, genome organization and homology to other tospoviruses. Arch. Virol. 141:85-98.
40. Satyanarayana, T., Mitchell, S. B., Reddy, D. V. R., Kresovich, S., Jarret, R., Naidu, R. A., Gowda, S., and Demski, J. W. 1996. The complete nucleotide sequence and genome organization of the M RNA segment of peanut bud necrosis tospovirus and comparison with other tospoviruses. J. Gen. Virol. 77:2347-2352.
41. Storms, M. M. H., Kormelink, R., Peter, D., Van Lent, J. W. M., and Goldbach, R. 1995. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. Virology 214:485-493.
42. van Kammen, A., Henstra, S., and Le, T. S. 1966. Morphology of tomato spotted wilt virus. Virology 30:574-577.
43. van Poelwijk, F., Prins, M., and Glodbach, R. 1997. Completion of the impatiens necrotic spot virus genome sequence and genetic comparison of the L proteins within the family Bunyaviridae. J. Gen. Virol. 78:543-546.
44. Verkleij, F. N. and Peters, D. 1983. Characterization of a defective form of tomato spotted wilt virus. J. Gen. Virol. 64:677-686.
45. Wang, M., and Gonsalves, D. 1990. ELISA detection of various tomato spotted wilt virus isolates using specific antisera to structural proteins of the virus. Plant Dis. 74:154-158.
46. 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 infecting watermelon in Taiwan. Plant Dis. 76:835-840.
47. Yeh, S. D., and Chang, T. F. 1995. Nucleotide sequence of the N gene of watermelon silver mottle virus, a proposed new member of the genus *Tospovirus*. Phytopathology 85:58-64.
48. Yeh, S. D., Chao, C. H., Cheng, Y. H., and Chen C. C. 1996a. Serological comparison of four distinct *Tospoviruses* by polyclonal antibodies to purified nucleocapsid protein. Acta Horticult. 431:122-134.
49. Yeh, S. D., Cheng, Y. H. Jih, C. L., Chen, C. C., and Chen, M. J. 1988. Identification of tomato spotted infecting horn melon and watermelon. Plant Prot. Bull. 30:319-420.
50. Yeh, S. D., Peng, Y. C., Chao. C. H., and Chen, C. C. 1998. Peanut chlorotic fan-spot virus is serologically and phylogenetically distinct from other tospoviruses. In: Recent progress in *Tospovirus* and thrips research. Edited by Peters, D. and Goldbach, R., Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. P. 42-43 (abstract).
51. Yeh, S. D., Sun, I. J., Ho, H. M., and Chang T. F. 1996b. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the S RNA of watermelon silver mottle virus. Acta Horticult. 31:244-260.

ABSTRACT

Yeh, S. D., and Chu, F. H. 1999. Occurrence of tospoviruses and recent developments for their rapid detection. *Plant Pathol. Bull.* 8:125-132. (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Tospovirus is the only genus in the arthropod-borne family *Bunyaviridae* that infects plants. In Taiwan, *Watermelon silver mottle virus* (WSMV), a tospovirus transmitted by *Thrips palmi* Karny in a persistent manner, has become a major limiting factor for growing watermelon and other cucurbits. In addition, a tospovirus transmitted by *Scirtothrips dorsalis* Hood was isolated from peanut in central Taiwan and designated as peanut chlorotic fan-spot virus (PCFV). Because the broad host range and complications in symptomatology, it is difficult to classify tospoviruses by biological properties. Thus, serological properties and the amino acid identities of the structural nucleocapsid proteins (NPs) are considered important descriptors for classification of tospoviruses. Recently, we have developed a fast and effective method to purify NPs of tospoviruses in different serogroups, using the leaf tissues from virus-infected local lesion host *Chenopodium quinoa* as starting material. Highly specific polyclonal and monoclonal antibodies were produced against NPs of tospoviruses from different serogroups. To further characterize WSMV at the molecular level, the complete nucleotide sequences of its L, M, and S RNAs have been determined by our laboratory. This represents the fourth tospovirus with the whole genomic information elucidated. In addition, the complete nucleotide sequence of PCFV S RNA has also been determined. Based on molecular information, specific primers for detecting different serogroups by RT-PCR and specific nucleic acid probes derived from N genes for identifying specific species are now available. The described serological and nucleic acid techniques provide a fast and accurate way for identification and diagnosis of tospoviruses.

Key words : *Tospovirus*, serological property, amino acid identity.