

臺灣菠菜黃化嵌紋病 I. 胡瓜嵌紋病毒之分離鑑定

廖吉彥^{1, 3} 盧耀村²

1. 台中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所植病系
 2. 台中市 國立中興大學植病系
 3. 聯絡作者：電子郵件 Jyliao@wufeng.Tari.gov.tw, 傳真 04-3338162
- 接受日期：中華民國 89 年 11 月 14 日

摘要

廖吉彥、盧耀村. 2000. 台灣菠菜黃化嵌紋病之研究 I. 胡瓜嵌紋病毒之分離鑑定。植病會刊 9:167-176.

平地菠菜的栽培，普遍發生黃化嵌紋病，將罹病植株經不同離心力分離，所得沉澱再分別用 Sepharose CL-4B 分子篩孔色層進一步純化，經汁液接種及電子顯微鏡觀察，發現在 100,000 g 分離純化試料之第一吸收峰處出現對菠菜有病原性，並觀察到大小約 29 nm 的多量球形粒子存在。在汁液接種測試中，對原寄主菠菜苗所出現的病徵與原來的症狀較相同，而認為是本病的主要病原。由單一分離系 (PL) 所得之病原，其物理性質為耐溫度性在 50 - 55°C，耐稀釋性為 10^{-2} - 10^{-3} 倍，耐保存性在 4°C 下時則為 6 - 8 天、室溫下為 3 - 5 天。病毒鞘蛋白經 SDS-PAGE 電泳其次單位蛋白分子量為 25 Kd。經家兔免疫注射製作血清其力價為 1024 倍，以 Ouchterlony 法分析血清類緣關係，甜椒 CMV 與田間菠菜罹病汁液與純化病毒呈完成同質反應 (homologus) 之現象。綜合試驗結果得知造成田間菠菜黃化嵌紋病毒主要的病毒為胡瓜嵌紋病毒 (Cucumber mosaic virus) 的一種。

關鍵詞：菠菜、黃化嵌紋病、寄主範圍、分佈、CMV

緒言

菠菜俗稱為菠薐菜 (*Spinacia oleracea*)，屬於藜科作物。適於第二期水稻收穫後的秋、冬季栽培，依種子銷售量推計，在本省之栽植面積每年約 3000 公頃以上⁽⁴⁾。

菠菜屬於長日照性植物，品種可分為角粒種 (*Spinacia oleracea* var. *spinosa*) 和圓粒種 (*Spinacia oleracea* var. *grabra*)。東方品種以角粒種，西洋種以圓粒種較多。台灣主要栽培的品種有：禹城、台灣角粒、牛若丸、台灣圓粒、豐 (Yutaka)、巨豐、三笠菠菜，其中以豐 (Yutaka) 日本進口雜交種一代，較受市場歡迎。主要產地在南投縣、雲林縣、彰化縣及台中縣等地⁽⁴⁾。為害田間菠菜黃化嵌紋病，病徵主要在葉部出現嵌紋、捲葉、黃化、皺縮及植株矮化等現象，影響產量及品質甚劇。有必要對其病因加以探討，進而研擬防治措施。

材料與方法

汁液接種之寄主反應與單斑分離

菠菜罹病植株採自台中一帶及埔里地區之菠菜園。將罹病株之葉片加入 10 倍量 (W/V) 之 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2)，研磨以棉花沾取汁液，接種至紅藜

(*Chenopodium amaranticolor*)、奎藜 (*C. quinoa*)、千日紅 (*Gomphrena globosa*)、曼陀羅 (*Datura stramonium*) 及菸草 (*Nicotiana tabacum* White Burley) 等如表一所示的判別植物。其後將紅藜接種葉上出現之局部病斑，經三次單斑分離，接種至菸草 (White burley) 及酸漿 (*Physalis floridana*) 上繁殖與保存，供作陰染法電子顯微鏡 (Hitach 7000) 觀察及寄主範圍、理化性質測定及病毒純化之材料。

不同離心力病毒之分離及接種試驗

選用菠菜罹病葉 15 克，加入 10 倍量 0.3 M 磷酸鈉緩衝液 (pH 7.2) 內含 0.01 M disodium ethylene diamine tetracetate (EDTA)、1% 2-mercaptoethanol (2-ME)，在 4°C 下磨碎，靜置 10 分鐘，以四層紗布過濾，濾液加入液體量 15% 有機溶媒 TFE (1,1,2,2-tetrachloro-1,1,2,2-tetrafluoroethane) 攪拌 3 分鐘，經 6000 g 離心 20 分鐘，取上澄液，加入 Triton X-100，使之含有汁液量 0.3%，處理 3 分鐘，經 10400 g 離心 20 分鐘，取其上澄液，經 65000 g 離心 60 分鐘，收集沉澱，取其上澄液，經 100000 g 離心 60 分鐘，收集沉澱，最後上澄液，以飽和硫銨鹽析沉澱濃縮。分別收集各沉澱，以原緩衝液再懸浮並濃縮後，供分子篩孔色層分析純化，在波長 254 nm 的紫外光監視器 (LKB4700

表一、菠菜黃化嵌紋病汁液接種在判別植物之反應

Table 1. Hosts reaction of spinach yellow mosaic virus disease and three times single lesion isolation on *Chenopodium amaranticolor* after sap inoculation.

Test plant	Reaction ¹			
	Sap inoculation of spinach yellow mosaic virus disease		Sap inoculation of three times of single lesion isolation on <i>Chenopodium amaranticolor</i>	
	Inoculation leaves	Upper leaves	Inoculation leaves	Upper leaves
Aizoaceae				
<i>Tetragonia expansa</i>	NL	Y	-	-
Amaranthaceae				
<i>Gomphrena globosa</i>	CL	-	-	-
Asteraceae				
<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	-	M	-	-
Caryophyllaceae				
<i>Dianthus caryophyllus</i>	-	-	-	-
Leguminosae				
<i>Cassia occidentalis</i>	-	-	-	-
<i>Glycine max</i>	-	-	-	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-	-	-
<i>Vicia faba</i>	-	-	-	-
<i>Vicia sinensis</i>	-	-	-	-
Chenopodiaceae				
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	CL	-	L	-
<i>C. quinoa</i>	CL	-	L	-
<i>C. murale</i>	-	-	-	-
<i>Spinacia oleracea</i>		M,S,Y,W	-	M,Sc
Solanaceae				
<i>Nicotiana tobacum</i> var. van-Hicks	-	M,Mo	-	M
<i>N. tabacum</i> var. white burley	-	M,Mo,Y	-	M
<i>N. debnyii</i>	-	Mo	-	Mo
<i>N. glutinosa</i>	-	M	-	M
<i>N. rustica</i>	-	M,S	-	M
<i>N. sylvestris</i>	-	M,S,Y	-	M,S,Y
<i>Capsicum annuum</i> var. blue star	-	Mo	-	Mo
<i>C. annuum</i> (Tobasco pepper)	-	Mo	-	M
<i>Datura metel</i>	-	-	-	-
<i>D. stramonium</i>	-	Mo	-	-
<i>Lycopersicon esculentum</i> var. farmers 301	-	-	-	-
<i>Physalis floridana</i>	-	Mo,M	-	Mo
<i>Petunia hybrida</i>		D	-	-
Cucurbitaceae				
<i>Cucumis sativus</i> var. spring swallow	-		-	-

¹. CL: chlorotic local lesions; D: distortion; L: local lesions; M: mosaic; NL: necrotic local lesions; Mo: mottle; -: no infection; S: stunt; Y: yellowing; W: wrinkle

UVCORD) 及記錄器 (LKB Biocal) 收集。即得純化病毒，供後續試驗之用。

物理性質測定

耐稀釋性 (Dilution end point). 將接種 PL 分離株之煙

草以 10 倍量 (W/V) 之 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 研磨，再以 10 倍稀釋法稀釋成 10^{-2} 及 10^{-3} 之濃度，再將各濃度汁液，分別接種至紅藜上，觀察其發病情形以決定其耐稀釋性。

耐熱性 (Thermal inactivation point). 依上法將病汁液分別放入 45、50、55、60、70 及 80°C 水浴中處理 10 分鐘，並立即使之冷卻，再分別接種至紅藜上，觀察其發病情形以決定其耐熱性。

耐保存性 (Ageing in vitro). 依上法將病汁液分別放置於 4°C 及 25°C 定箱中經四天、五天、六天、七天、及八天，分別取出接種至紅藜上，觀察其發病情形以決定其耐保存性。

上述試驗，皆以處理前立即接種做為對照組。

罹病材料超薄切片與病毒在組織內分佈

取接種 PL 分離株後第 10 天之煙草病葉為材料，將病葉，以刀片切成約 1.5 x 1.5 mm 之大小，以 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde) 行前固定，以 0.1 M 磷酸緩衝液水洗四次，再以 1% 四氧化鐵 (OsO_4) 行後固定，再以分別 30%、50%、80%、95%、100% 酒精系列脫水。之後將組織塊移入前置液 (100% 酒精：LR White 樹脂 = 1：1) 進行滲透，隔夜再移入純 LR White 樹脂中⁽⁶⁾。最後將組織塊移入矽膠鑄造模板 (20 孔) 以 LR White 樹脂包埋⁽²⁾。再移入 60°C 烘箱 15 小時聚合硬化。硬化後之材料以超薄切片機切取 60 - 90 nm 的切片，最後以 2% 醋酸鈾 (uranyl acetate) 與檸檬酸鉛 (lead citrate) 進行雙重染色，完成鏡檢之準備工作。

蛋白鞣分子量分析

以接種 PL 分離株之煙草為純化之材料，取純化之病毒試液，以 5 倍解離緩衝溶液 (0.125 M Tris-HCL pH6.8、2% SDS、10% glycerol、0.001% bromophenol、5% 2-ME) 於 100°C 加熱 3 分鐘，進行迷你式膠體電泳分析，12% 不連續十二烷基硫酸鈉聚丙烯胺膠體電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 法係依 Laemmli⁽⁶⁾ 之方法，電泳緩衝液中含有 25 mM Trisbase、192 mM Glycine、1% SDS pH8.3，在 100 伏特電壓，進行連續泳動 90 分鐘電泳，泳動後膠片，以 0.025% Coomassie blue R 250 (CBR 250) 染色一小時後，再以 20% 甲醇，10% 醋酸溶液脫色 30 分鐘，觀察在膠體上所出現之蛋白帶數目及和已知的 Marker (fructose-6-phosphate kinase 85.2kDa、glutamate dehydrogenase 55.6 kDa、aldolase 39.2 kDa、triose phosphate isomerase 26.6 kDa、trypsin-inhibitor 20.1 kDa、lysozyme 14.3 kDa) 比較分子量之大小與範圍。

抗血清製備與抗體IgG抽取

多元抗體製備. 取接種 PL 分離株之煙草病葉 100 g 依上述分離純化過程，將經 100000 g 離心 60 分鐘之沉澱收集，即為病毒懸浮液中，加入等量之完全補助劑 (Bacto Freund's complete adjuvant) 充分乳化後，免疫注射至紐西蘭白兔後腿之肌肉內，每週注射一次連續四次。最後一次注射後第七天自耳背靜脈採血，於室溫下靜置凝固，後移入 37°C 定溫箱中一小時，然後以 5000 g 離心 10 分鐘，取上澄液即為抗血清。收集後加入 NaN_3 使之含有 0.01%，分裝成一毫升，置於 -75°C 下冷凍保存，供血清試驗。

免疫球蛋白 IgG 之抽取. 參照 Ishikawa *et al* ⁽¹⁶⁾ 取新鮮抗血清 10 毫升於透析膜中，放入 0.01 M PBS 緩衝液中透析過夜，後於室溫下加入攪拌 1.2 g 無水硫酸銨，溶解靜置 30 分鐘，再以 8000 g 離心 15 分鐘，其沉澱物再以 0.01 M PBS 懸浮成 4 ml，再加入 0.48 g 無水硫酸銨攪拌鹽析，溶解靜置後，再以同樣離心力離心 15 分鐘，最後的沉澱物用 1 ml 0.01 M PBS 懸浮，同緩衝液中透析過夜。所獲得抗體通過 5 ml 之 DEAE cellulose DE 52 (Whatman)，收集在波長 280 nm 的紫外光 (LKB Uvicord II) 監視下最高吸收值之試液。

力價測定及純度判定

取製備之抗血清經系列稀釋，後以環形界面法 (ring test) 測試其力價。再利用凝膠雙擴散反應法 (Ouchterlony method) 測定其純度與病毒種類，方法係仿照 Purcifull ⁽⁷⁾

等所述方法進行，抗血清包括上述製備血清，抗原之製備為每個樣本取病葉一克加一毫升蒸餾水研磨後，再加入等量 3% SDS 混合後過濾備用，抗原試料包括放入純化病毒、田間菠菜罹病葉液、甜椒 CMV ⁽³⁾、接種供試病毒之煙草病葉、健全煙草汁液為對照，供作比較。

結 果

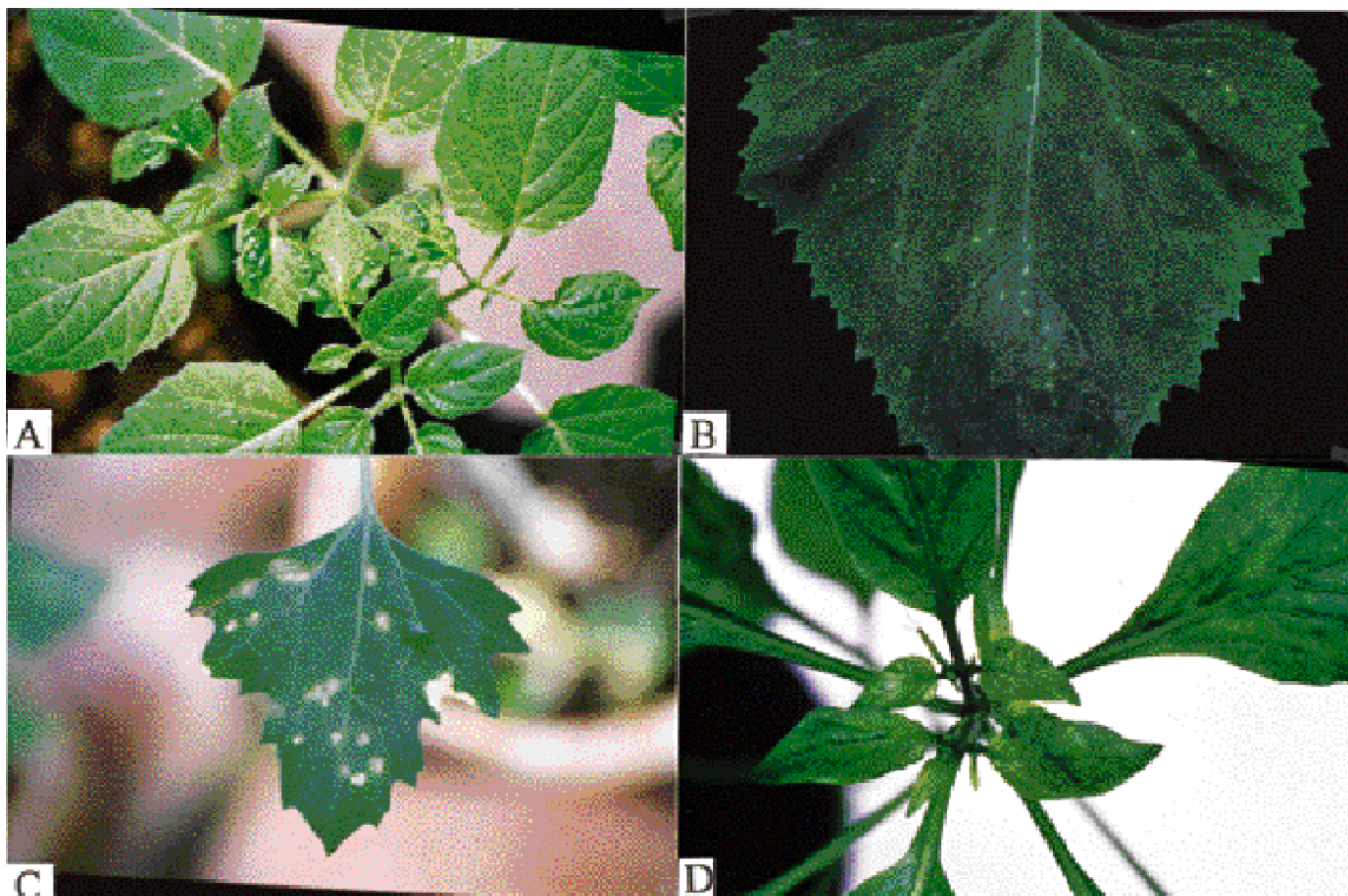
汁液接種之寄主反應與單斑分離

採自田間菠菜病葉 (圖一) 分別接種至表一 (Table 1) 所列之八科 27 種不同判別植物上，由寄主之接種反應，以分離侵入感染之病毒種類，結果共有 5 科 18 種出現病徵，其反應如表一所示。在紅藜與奎藜，兩者在接種葉片上出現局部病斑 (圖二)。由於病斑之大小形態、及病斑中央是否有壞疽現象，共單斑分離 5 種分離斑點，包括約 0.3 mm 大病斑無壞疽 (BNN)、大病斑有壞疽 (BNE)、約 0.1 mm 小病斑無壞疽 (SNN)、小病斑有壞疽 (SNE) 及針刺狀的小病斑 (PL)，分別將各單一分離系接種至煙草 White Burley 上繁殖供為試驗材料，結果只有針狀小病斑分離系 (PL) 可以在煙草上出現斑駁病徵，再以此單一分離系 (PL) 回接至菠菜，結果出現葉片略向下捲曲的微嵌紋病徵，以此為接種源，同樣的汁液接種至如表一寄主植物測試其寄主範圍，結果如表一所示。其餘四種分離株，皆無法在煙草 W.B. 上感染，再將這四種分離株分別接種於甜椒、辣椒及酸漿等植物上，結果仍無病徵出現。最後選擇致病性較強之針刺狀的小病斑為主要研究對象。



圖一、田間菠菜感染菠菜黃化嵌紋病害之病徵

Fig. 1. A spinach plant showing yellow mosaic symptoms in the field.



圖二、菠菜黃化嵌紋病所分離之病毒在不同寄主之病徵，(A):在酸漿上斑駁病徵，(B):紅藜產生局部病斑，(C):奎藜產生局部病斑，(D)甜椒斑駁病徵

Fig. 2. Symptoms of a spinach yellow mosaic agent on different inoculated indicator plants.(A): showing mottle on *Physalis floridana*; (B): chlorotic local lesions on a leaf of *Chenopodium amaranticolor*; (C): chlorotic local lesions on a leaf of *Chenopodium quinoa*; (D): showing mottle on *Capsicum annuum* var. Blue star.

不同離心力病原之分離及接種試驗

將菠菜罹罹病株，經方法所述純化，將 65,000 g 與 100,000 g 離心沉澱，與上澄液用飽和硫銨鹽析沉澱，分別供電子顯微鏡觀察及汁液化接種至表二所示指示植物，結果在 65,000 g 試料之第一吸收值試液，可以觀察到大球形的粒子及絲狀粒子存在 (圖三 A、B)，第二及第三吸收值試料，則為寄主不定形蛋白存在。在 100,000 g 分離試料中，第一吸收值試料中觀察到小球形粒子 (圖三 C)，第二吸收值試料則為似核糖體均一的粒子，第三吸收值則為不定形的蛋白粒子，而上澄液鹽析的試料則觀察到皆為無均一形態的不定形蛋白粒子存在，分別汁液接種測試病原性結果如表二所示。

依表二得知 65,000 g 試料之第一吸收值試液，無法感染菠菜，因而從接種病毒供試之煙草 (White burley) 分離純化病毒時，直接取 100000 g 沉澱，經 sepharose CL-4B 分子篩孔進一步純化，在波長 254 nm 監視下，收集第一

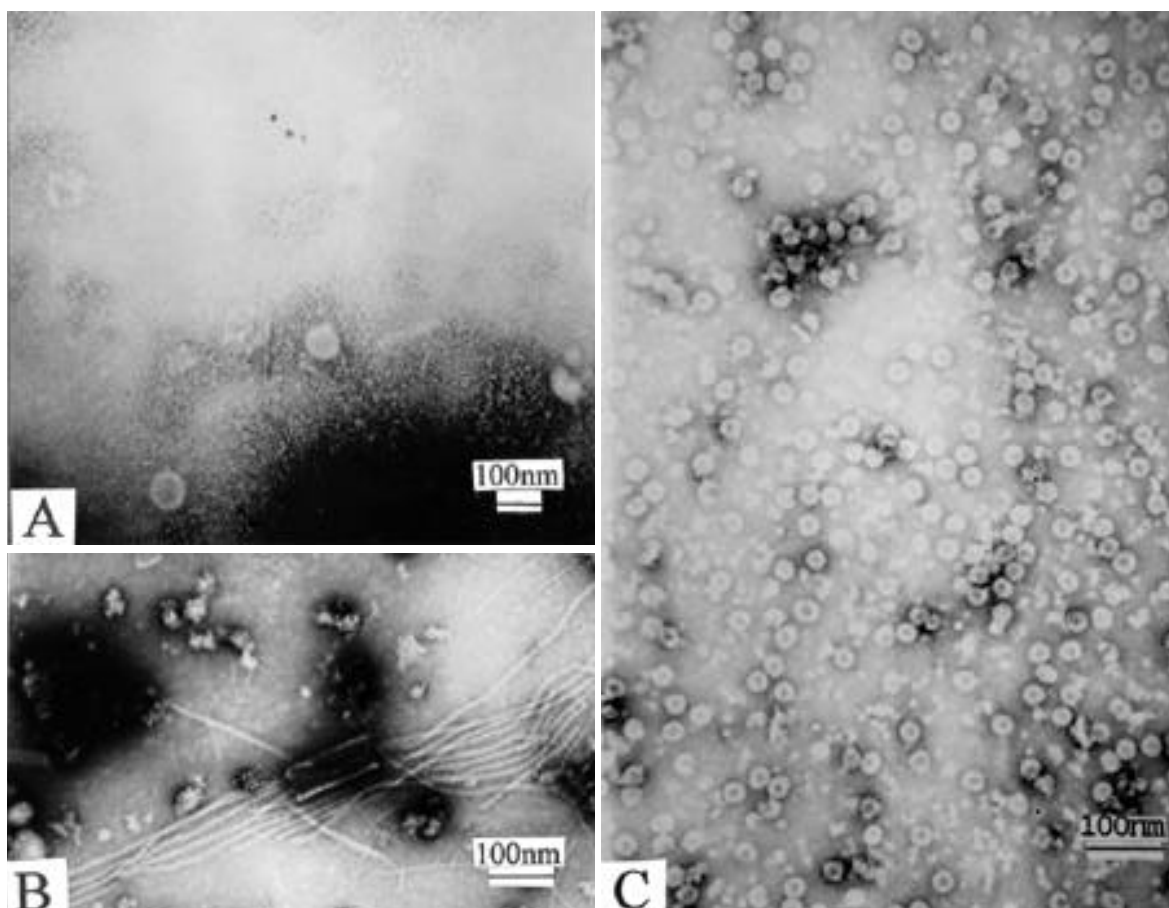
表二、菠菜黃化嵌紋病株在不同離心力沉降試料，經 Sepharose CL-4B 分子篩孔色層分析純化，所得分離試料之病原性測定

Table 2. Infectivity tests of fractions of sample from diseased spinach yellow mosaic leaves after various ultracentrifugation and sepharose molecular sieve chromatography.

Various centrifuge gravity	Raction of indicator plant ^{1,2}						
	C. amar.	G. glob.	P. flor.	Tobacco W.B.	Tobacco N.rust.	Sweet peppe	Spin-ach
65000 g	CL	Cl	Mo	Mo	M	Mo	-
100000 g	CL	-	Mo	Mo	M	Mo	M, Sc
Superantent	-	-	-	-	-	-	-

¹ L: local lesion, M: mosaic, Mo: mottle, -: no infection CL: chlorotic lesion, Sc: scrolling,

² Indicator plant. C. amar.: *Chenopodium amaranticolor*; G. glob.: *Gomphrena globosa*; P. flor.: *Physalis floridana*.



圖三、菠菜黃化嵌紋病原經 Sepharose CL-4B 管柱純化後在電子顯微鏡觀察下之病毒粒子形態 (A) 在離心力 65000 g 下所得大球形顆粒 (B) 在離心力 65000 g 下所得絲狀顆粒 (C) 在離心力 100000 g 下所得小球形顆粒

Fig. 3. Particles of spinach yellow mosaic agents purified through separation by Sepharose CL-4B column (0.9x60 cm). (A):large spherical particles observed in the sample centrifuged at 65000 g ; (B):filamentous particles observed in the sample centrifuged at 65000 g ; (C):small spherical particles observed in the sample centrifuged at 100000 g (Bar:200nm).

吸收波具有吸收值的試料，分別接種至菠菜苗及煙草 (White burley) 測試病原性。接種試料之煙草 (White burley) 出現嵌紋病徵 (圖四)，菠菜出現捲葉病徵 (圖五)。電子顯微鏡觀察結果，多數球形粒子存在，經計算 100個病毒粒子，其大小分佈在 29 nm，約佔 83% (圖六)。將具有病原性的第一吸收峰試液，利用 Hitach U-3410分光光譜儀在核蛋白吸收值 260 nm 波長測得吸收值為 0.83，依照 Beer's Lambert law 公式 $E (1 \text{ mg} / 1 \text{ ml}, 260 \text{ nm}) = 5$ ，換算其病毒 (核蛋白) 濃度為 0.17 mg/ml。

物理性質測定

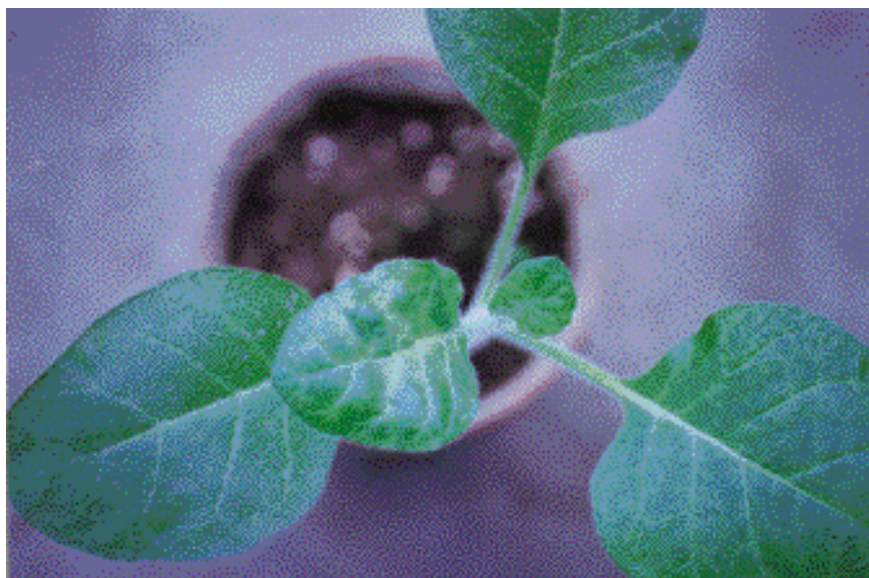
依方法所述從分離株 (PL) 接種在煙草為材料，測定本病毒的耐溫度性、耐稀釋性及汁液的耐保存性，所得結果得知本病毒的耐溫度性在 50 - 55°C 之間，汁液稀釋性在 10^2 - 10^3 倍之間，耐保存性在室溫下為 3 - 5 天，而在 4 °C 下時則為 6 - 8天尚有活性。

超薄切片與病毒在組織內分佈

利用超薄切片法，將罹病煙草葉片經固定、脫水、包埋及切片等過程，所得之組織切片，經醋酸鉍 (Uranyl acetate) 和檸檬酸鉛 (Lead tartrate) 雙重染色增加對比後，在電子顯微鏡下觀察，結果發現在煙草 病葉細胞質中，發現近似橢圓形的空胞內含有多量的球形病毒粒子，直徑大小約為 29 nm (圖七 A、B)，而細胞核內則未發現此種粒子存在。而對照組的健全植株，則無法觀察到此種粒子的存在。

鞘蛋白分子量大小之電泳動測定

以接種 PL 分離株之煙草為純化之材料，取純化之病毒試液後，多試料以 5 倍解離緩衝溶液加熱裂解，再經 12% polyacryamide 膠體電泳分析，並以已知分子量蛋白為標記，經比對結果得知本病毒的蛋白鞘的次單位體之分子量大小約為 25 Kd。



圖四、菠菜黃化嵌紋所純化病毒在煙草(White Burley)上之斑駁嵌紋病徵
Fig. 4. A tobacco (White burley) plant showing mottle mosaic symptoms after inoculated with spinach yellow mosaic virus.



圖五、菠菜黃化嵌紋病毒接種在菠菜苗所引起之捲葉病徵
Fig. 5. A spinach seedling showing leaf roll symptoms after inoculated with spinach yellow mosaic virus.

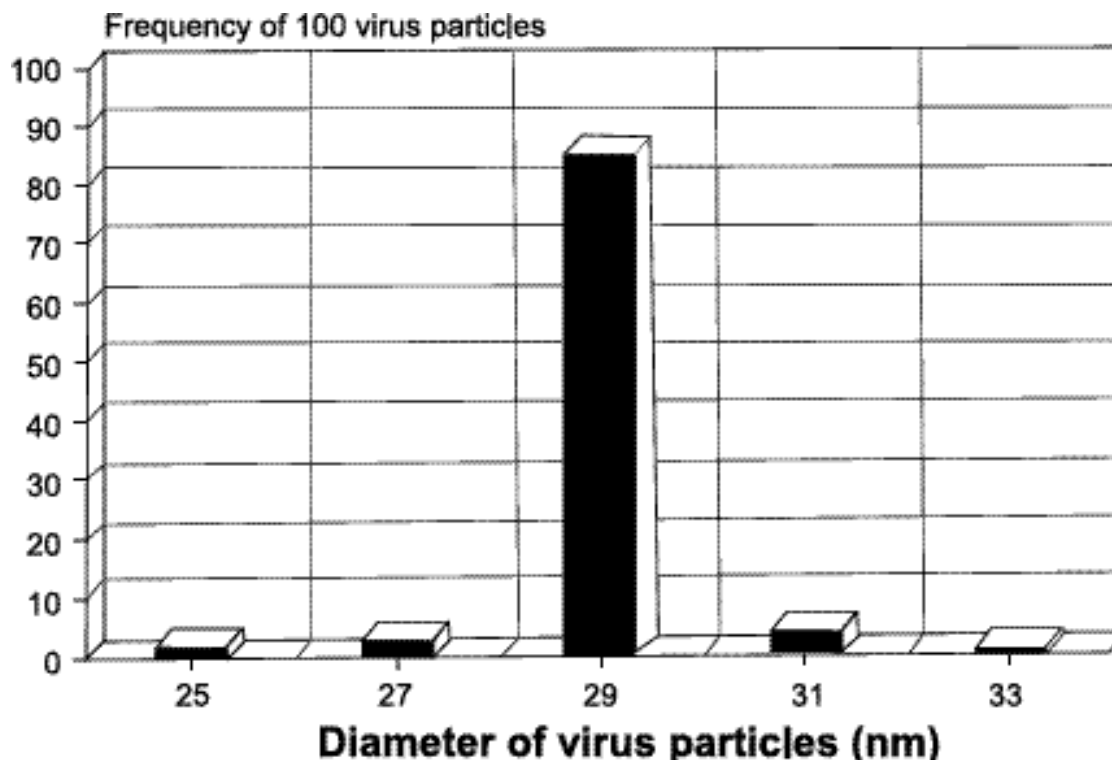
抗血清製備與抗體 IgG 抽出

抗血清製備 自免疫後之紐西蘭白兔處取得30 ml抗血清。

血清免疫球蛋白 (IgG) 之抽取. 取 10 cc 的上述新鮮抗血清，利用硫酸鈉沉澱法取得純化之抗體 IgG，用蛋白計 (Clinical refractometer) 測試其濃度約為 5 gm/ml 共 3 ml。

力價測定及純度判定

環形界面反應法. 以接種 PL 分離株之煙草為純化之材料所得之球形病毒試液為抗原，將上述製備所得的抗血清，同時以免疫注射前採血的正常血清為對照，如方法所述進行環形界面反應法測定力價，結果為 1024 倍。



圖六、菠菜黃化嵌紋病毒經 Sepharose CL-4B 管柱純化之病毒粒子大小分布

Fig. 6. Frequency of particle sizes of spinach yellow mosaic virus measured through the separation by Sepharose CL-4B column.

凝膠雙擴散反應法 (Ouchterony method) 測定純度.

利用瓊脂擴散法，將 4 個病毒試液經 SDS 處理與製備抗血清反應，結果除健全煙草汁液外，抗血清與 4 個病毒試液產生明顯沉澱帶 (precipitin bend) (圖八)，且甜椒 CMV 與田間菠菜罹病葉液與純化病毒呈完成連接之現象，出現明顯沉澱帶的時間亦相同。

討 論

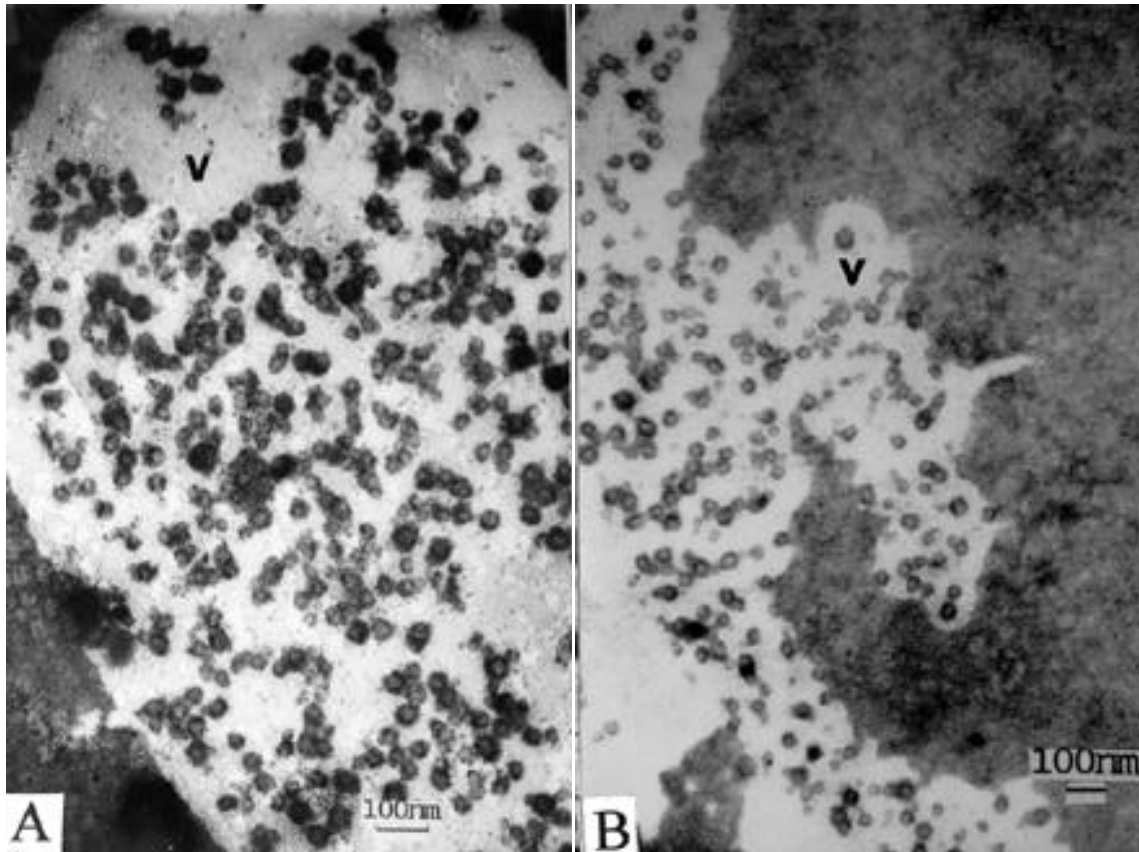
以往本省無菠菜黃化嵌紋病之報告，僅於周氏⁽¹⁾「蔬菜主要病害彩色圖鑑」中略提，書中所述菠菜幼葉因感染菠菜幼嵌紋病而呈捲縮畸形，其病徵與本實驗中接種供試病毒之菠菜幼葉病徵相同。

以接種 PL 分離株之煙草為純化材料，在 100000 g 的病毒分離試液中，經過 Sepharose CL-4B 分子篩孔色層分離後，病原性出現在第一吸收峰試料中段，若以 Sepharose CL-2B 分子篩孔色層分離純化，則病原性出現在第一吸收峰試料中的後端，作成電子顯微鏡試料觀察，也只有具有感染菠菜的病原性試料中，觀察到許多大小在 29 nm 球形粒子存在，而其餘的吸收峰試料，則為不定形的植物蛋白及大小約 10 - 12 nm 之核糖體，由病原性及均一粒子形態而知此 29 nm 大小的球形粒子是為害菠菜的病原。

採田間黃化嵌紋病徵的菠菜罹病葉為材料，直接如方法所述過程加以分離純化，將不同離心力試料陰染及病原性測定中，發現在 65000 g 具有感染力之第一吸收峰試料中，可以觀察到大小約 78 nm 的球形粒子；及長絲狀粒子存在，經病原接種測定中，菠菜不具病徵。但在紅藜、千日紅出現局部病斑及煙草 *N. rustica* 出現葉皺縮變形病徵，由千日紅出現壞疽斑初步推知此大球形粒子較屬 *Tospovirus* 群病毒。由上述的分離純化及病原性的測定，推知本省菠菜栽培普遍常出現黃化嵌紋病徵，可能三種以上病毒複合感染所造成。

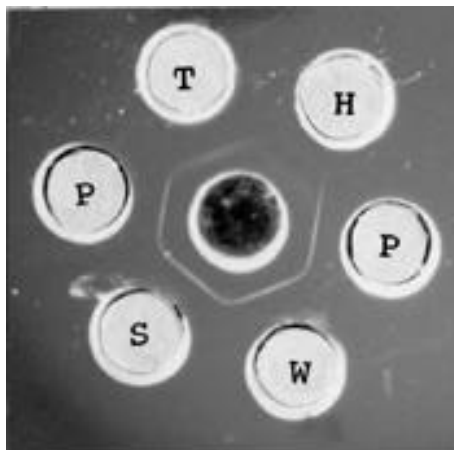
由上述中得知在菠菜罹病株之分離純化條件下，在 100000 g 的分離試料中，觀察到多量之球形粒子存在，認為是本病的主要病原，其汁液接種至菠菜所引起的病徵，與經紅藜三次單斑分離株 (PL)，接種至菠菜確定具有病原性後，二者對菠菜所引起的病徵相同，因而接種在煙草 W.B. 及酸漿上供病毒的純化與鑑定用材料。為何二者所引起的病徵與田間發病病徵不一致，可能本實驗只針對其中一種主要病原進行研究，所引起的病徵與田間實際發病病徵有落差，有待繼續探討。

統計國外文獻感染菠菜病毒種類多達四十種之多^(11,12,13,14)，其中除了 Spinach necrotic yellow dwarf virus 等 18 種為桿狀或絲狀外，其餘皆為球形。根據久保氏⁽⁵⁾ Tobacco necrotic dwarf virus (TNDV) 在蔓陀羅 (*Datura*



圖七、菠菜黃化嵌紋病毒在煙草(White Burley)病葉超薄切片病毒之分布與粒子形態 (A、B) 空胞內含有多量的球形病毒粒子 v：空胞

Fig. 7. Particle morphology and distribution of the virus in an inoculated diseased tobacco leaf. v : vacuole



圖八、菠菜黃化嵌紋抗血清與各抗原之凝膠雙擴散反應中央:胡瓜嵌紋病毒抗血清;H:健全煙草汁液;T:感染菠菜黃化嵌紋病毒煙草粗汁液;P:經Sepharose CL-4B 管柱純化後之菠菜黃化嵌紋病毒試液;S:菠菜黃化嵌紋病田間病株;W:甜椒CMV病汁液

Fig. 8. Serological reactions in agar gel double diffusion. Central well: antiserum of Cucumber Mosaic Virus; H: health crude sap from tobacco leaves; T: diseased crude sap from tobacco leaves; P: purified virus from tobacco leaves (through Sepharose CL-4B column); S: crude sap of field diseased spinach plant leaves; W: crude sap of sweet pepper infected by CMV.

stramonium) 上產生系統性葉脈間退綠，在菸草 (*Nicotiana sylvestris*) 葉片上產生葉脈黃化與系統性的葉脈間退綠，雖然在 SDS-PAGE 電泳所得之鞘蛋白次單位約為 25 k 道爾敦與本實驗相同，然而 TNDV 屬於 Luteovirus 篩管局限型之病毒，由蚜蟲以永續性傳播，不汁液傳播。除此之外在自然田間只感染菸草及菠菜。而本菠菜黃化嵌紋病毒雖然在煙草、酸漿與蔓陀蘿上反應相同，但可經由汁液接種傳播，在菸草 (*N. sylvestris*) 並不產生篩管壞疽，本病毒的寄主範圍也較 Tobacco necrotic dwarf virus TNDV 之寄主廣，認為本病異於 TNDV，即不屬於 Luteovirus 群。

又 Bhargava 氏⁽⁸⁾報告，在印度為害菠菜的 CMV 至少有二種系統 (strain) 存在，一種是引起菠菜不正常之斑點病徵，並在菸草 W.B. 及 *N. glutinosa* 上產生局部病斑，稱為 CMV spinach strain，此系統在胡瓜、蔓陀蘿、番茄上產生壞疽局部病斑，在西瓜上出現水浸狀局部病斑。另一種系統引起四季櫻草 (*Primula obconica*) 並能在菸草上產生輕微斑駁病徵稱為 CMV primula strain。此系統在胡瓜上產生系統病徵，在西瓜上壞疽局部病斑，在菸草 *N. glutinosa* 系統性斑駁及葉片變形，在蔓陀蘿產生擴散的壞

痘病斑，在番茄上產生葉片變形等，和本省所分離得到的菠菜黃化嵌紋病毒在寄主範圍有所不同及其病徵只和 *primula strain* 在煙草 *N. glutinosa* 上相同，其餘皆有所差異，而認為和印度所發現的菠菜病毒也有所不同。

Wilson *et al*⁽⁹⁾ 報告在美國德州為害菠菜的病毒有 beet curly top virus、CMV、spinach yellow dwarf virus、tobacco ringspot virus 及另一種尚未命名的球形病毒，但通常皆與 CMV 複合感染，此球形病毒分離和鑑定的結果認為菠菜 CMV，和以前所報告的菠菜 CMV 的 S strain 有血緣關係，因此命名為 CMV S strain 的 Texas spinach isolate。其寄主範圍包括番杏等 39 種植物可被感染，其中番杏、千日紅、紅藜、奎藜、菠菜、蔓陀蘿、酸漿、矮牽牛、甜椒及煙草 *Nicotiana clelandii*、*N. glutinosa*、*N. rustica*、*N. sylvestris*、*N. tabacum* 之寄主和本病毒相同，而且兩者皆不感染菜豆 (*Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*)。但是與本病毒寄主範圍有所差異的寄主有胡瓜、大豆、番茄，而其病毒直徑為 29 nm，也和本病毒 (29 nm) 為相同。其寄主範圍的相似性也有 83%，而其差異原因認為地理環境或品系的不同所產生。

Iwaki⁽¹⁵⁾ 日本報告從菠菜葉片呈現皺縮病徵的罹病葉分離到 Cucumber mosaic virus (CMV) SR strain，即對菸草 (*N. debneyi*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Samsun) 產生輕微嵌紋病徵，在千日紅、番茄、菸草 (*N. clelandii*、*N. tabacum* cv. Bright yellow、*N. tabacum* cv. Xanchi NC)、胡瓜、茼蒿、萵苣及百日草上產生無病徵的感染，而在菸草 (*Nicotiana debneyi*、*N. glutinosa* 及 *N. tabacum* cv. Samsun) 及甜椒卻產生系統性嵌紋病徵，對甜菜、紅藜、奎藜、千日紅、矮牽牛、豇豆及番杏，產生局部病斑的病徵，但不感染菜豆、大豆、與蠶豆，與本省分離到的菠菜黃化嵌紋病的寄主範圍也相類似。本省所分離到的菠菜黃化嵌紋病毒在豇豆無病徵外，其餘病徵皆與 CMV SR strain 相同 (如表一)。本病毒與 Iwaki 氏⁽¹⁵⁾ 報告之 cucumber mosaic virus (CMV) SR strain 及 Wilson *et al*⁽⁹⁾ CMV-S 的 Texas spinach isolate 及 Van Regenmortel *et al*⁽¹⁰⁾ 的 CMV 鞘蛋白的次單位類似。

謝 辭

本文係 1992 - 1994 年間於中興大學植物病理研究所進修期間完成之碩士論文的一部份，其間蒙系上師長指導，謹此致謝。

引用文獻

1. 周廷光. 1986. 蔬菜主要病害彩色圖鑑. P30. 淑馨出版

- 社. 台北。
2. 陳翠妙、陳煜焜、陳脈紀、葉錫東. 1999. 引起茼蒿白化嵌紋病之蕪菁嵌紋病分離株之寄主反應、細胞學特性及血清學性狀. 植病會刊 8:73-82。
3. 黃玉堂、劉秀靈、盧耀村. 1994. 利用煙草白肋種 (White Burley) 分離甜椒病毒. 植病會刊 3:91-100。
4. 臺灣省政府. 1993. 台灣農林年報. 86頁. 台灣省政府農林廳編印. 臺灣南投。
5. 久保 進、高浪洋一. 1977. 關東地方 發生新病. 日本植物病理學會刊 43:76。
6. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature (London) 227:680-685.
7. Purcifull, D. E. and Batchelor, D. E. 1977. Immunodiffusion Tests with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Treated Plant Viruses and Plant Viral Inclusions. Bull. No.783, 39 pp. Agric. Exp. Stn. Uni. Fl., Gainesville.
8. Bhargava, K. S. 1951. Some properties of four strains of cucumber mosaic virus. Ann. App. Biol. 38: 377-388.
9. Wilson, A. D., and Halliwell, R. S. 1985. Characterization and field studies of a cucumber mosaic virus isolate from spinach in winter garden area of Texas. Plant Dis. 69:751-754.
10. Van Regenmortel, M. H. V., Hendry, D. A., and Baltz, T. 1972. A reexamination of the molecular cucumber mosaic virus and coat protein. Virology 49: 647-653.
11. Bailiss, K. W., and Okonkwo, V. N. 1979. Virus infection of spinach (*Spinacia oleracea* L.) in Britain. J. Hort. Sci. 54: 4, 289-297.
12. Bos, L., Huttinga, H., and Maat, D. Z. 1980. Spinach latent virus, a new ilarvirus seed-borne in *Spinacia oleracea*. Neth. J. Plant Pathol. 86: 2, 79-98.
13. Zenabayashi, R., Hanada, K., Iwaki, M., and Shibukawa, S. 1983. A strain of cucumber mosaic virus (CMV-SR) causing rugose symptom on spinach. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 49:716-719.
14. Weidemann, H. L., Lesemann, D., Paul, H. L., and Koenig, R. 1975. Broad bean wilt virus as the cause of a new yellows disease of spinach in Germany. Phytopathologische-Zeitschrift. 84: 3, 215-221.
15. Iwaki, M. 1986. Control of CMV mosaic disease of tomato by pre-inoculation of CMV-SR strain. p.64-70. in Plant Virus Diseases of Horticultural Crops in the Tropics and Subtropics. FFCTC. Taipei.
16. Ishikawa, E., Imagawa, M., Hashida, S., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y., and Ueno, T. 1983. Enzyme-labeling of antibody and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. J. Immunoassay 4:209-327.

ABSTRACT

Liao, J. Y.^{1,3}, and Lu, Y. T.² 2000. Studies on spinach yellow mosaic disease. I. Isolation and identification of cucumber mosaic virus. *Plant Pathol. Bull.* 9:167-176. (¹ Department of Plant Pathology, Taiwan Agriculture Research Institute, Wu-feng, Taichung 413, Taiwan, R.O.C. ; ² Department of Plant Pathology National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C. ; ³ Corresponding author, E-mail: Jyliao@wufeng.Tari.gov.tw)

Spinach grown in lowland areas of Taiwan was found widely exhibiting yellow mosaic symptoms, which is possibly caused by virus infection. A virus isolate (PL) was obtained from the symptomatic spinach and subsequently tested for its infectivity on 27 plant species from 9 Families by mechanical inoculation. Twelve species in Chenopodiaceae and Solanaceae but none of the plants from Leguminosae and Cucurbitaceae were infected. Inoculation of the PL isolate on spinach seedling induced symptoms similar to those observed from the fields. Infectious virus particles of PL were obtained by centrifuging the homogenates of the diseased tissue at 100,000 g for 60 min followed by chromatographing through Sepharose CL-4B column. In electron microscopy, the morphology of virus particles was found to be isometric about 29 nm in diameter. Similar sized and shaped virus particles were also detected in ultra-thin sectioned diseased spinach tissue. The thermal inactivation point of PL isolate is 50-55°C, dilution end point is 10^{-2} to 10^{-3} and the longevity in vitro is 3 to 5 days under room temp and 6 to 8 days at 4°C. By electrophoresis analyses, molecular weight of the coat protein subunit of PL was estimated as 25 kDa. An antiserum was prepared against the purified virions and found to react strongly with its homologous antigen but not to the healthy control spinach in SDS-immunodiffusion test. Furthermore, this antiserum gave indistinguishable reaction against antigens of PL isolate and an isolate of cucumber mosaic virus (CMV) from sweet pepper, indicating that PL isolate from spinach was serologically identical to CMV. This result corresponds to those documented in USA and Japan that CMV is a causal agent of spinach mosaic disease.

Key words : Spinach, yellow mosaic, host range, cucumber mosaic virus