

罹病康乃馨之 *Carnation mottle virus* 的分離與鑑定

陳慶忠¹ 林靜宜² 柯文華¹ 詹富智^{2,3}

1 行政院農委會台中區農業改良場

2 國立中興大學植物病理學系

3 連絡作者：電子郵件 fjjan@nchu.edu.tw，傳真：+886-4-22854145

接受日期：中華民國92年8月31日

摘要

陳慶忠、林靜宜、柯文華、詹富智. 2003. 罹病康乃馨之 *Carnation mottle virus* 的分離與鑑定. 植病會刊12:199-208.

於彰化縣北斗鎮、田尾鄉及永靖鄉田間栽種之康乃馨 (*Dianthus caryophyllus* L.) 及康乃馨雜交品系“小可愛 (Kooij Echo kgr, Holland)”發現類似感染病毒而引起植株上方分蘖心葉附近葉片產生黃化壞疽斑點或黃化斑駁等徵狀。上述病組織初步以陰染法於電子顯微鏡觀察到一種直徑約 32 - 33 nm 之球形病毒顆粒。以雙向免疫擴散反應及酵素聯結免疫分析等血清學方法分析顯示上述康乃馨所分離之病毒分離株與康乃馨斑駁病毒 (*Carnation mottle virus*, CarMV) 血清呈現正反應。超薄切片罹病組織以電子顯微鏡鏡檢於葉肉細胞之細胞質內可觀察到病毒顆粒呈分散或結晶狀排列，大小與陰染法之球形病毒顆粒相似。以電泳分析 (SDS-polyacrylamide) 此康乃馨病毒分離株得到一分子量約 40 kDa 之鞘蛋白。進一步針對 CarMV 鞘蛋白基因保守區域設計專一性引子對，利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 增幅 CarMV 康乃馨分離株鞘蛋白基因並進行選殖及定序，將所得之 1047-nt (nucleotides) 鞘蛋白基因核酸序列與基因庫 (GenBank) 中已發表之各 CarMV 分離株鞘蛋白基因序列進行比對分析，經比對後發現與 CarMV 各分離株間具 95.6 - 97.9% 之核酸序列相同度 (nucleotide identity) 及 98.0 - 99.1% 的胺基酸序列相同度 (amino acid identity)。綜合以上試驗結果分離自台灣康乃馨引起黃化斑駁病徵之病毒鑑定為 CarMV 的一分離株，同時 CarMV 感染康乃馨在台灣亦為首次記錄。

關鍵詞：康乃馨、康乃馨斑駁病毒、CarMV、鑑定

緒言

香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 為石竹科 (*Caryophyllaceae*) 之多年生草本植物，英名 carnation，中名為康乃馨、香石竹及麝香石竹，可區分為單花型大花種、多花型小花種及多花型迷你種等三種品系，具有紅、黃、淺、淡、雙色等多種花色。康乃馨原產於地中海沿岸，現已分佈至歐洲、日本、澳洲、以色列、美國及東南亞等地區，為全球重要經濟花卉作物⁽²¹⁾。目前臺灣的栽培品系均為雜交種⁽⁴⁾，根據民國91年農業統計年報顯示臺灣康乃馨年種植面積 88 公頃，切花收量為 4,748 千打，主要種植於南投、彰化、台中等縣市⁽¹⁾。中部地區種植之康乃馨屬傳統之單花型大花種，唯近年部份花農引進小朵的多花型迷你康乃馨“小可愛”，由於栽培經驗的累積，所得技術亦漸臻成熟⁽³⁾。

目前已知感染康乃馨之病毒種類至少有十七種^(3,21)，其中以康乃馨蝕環病毒 (*Carnation etched ring virus*,

CERV)⁽¹⁹⁾、康乃馨潛伏病毒 (*Carnation latent virus*, CLV)⁽²⁷⁾、康乃馨斑駁病毒 (*Carnation mottle virus*, CarMV)⁽¹³⁾、康乃馨壞疽條紋病毒 (*Carnation necrotic fleck virus*, CNFV)⁽¹⁶⁾、康乃馨輪紋病毒 (*Carnation ringspot virus*, CRSV)^(14,25) 及康乃馨葉脈嵌紋病毒 (*Carnation vein mottle virus*, CVMV)⁽¹⁵⁾ 等六種病毒較具經濟重要性⁽²¹⁾。而在國內已報告發生之病毒種類有 CERV⁽⁵⁾、康乃馨微嵌紋病毒 (*Carnation mild mottle virus*, CMMV)⁽⁵⁾ 及洋桔梗壞疽病毒 (*Lisianthus necrosis virus*, LNV)⁽³⁾ 等三種，均為球形病毒。CERV 屬於 *Caulimovirus*，直徑 50 nm，可經由蚜蟲以半永續性方式傳播⁽²⁾；CMMV 屬於 *Comovirus*，直徑 29 nm⁽²⁰⁾；LNV 屬於 *Tombusvirus*，直徑 32 nm⁽⁶⁾。

2002 年 4、5 月間於彰化縣北斗鎮、田尾鄉及永靖鄉種植之部份康乃馨，發現其上方葉片產生壞疽斑點或淡黃色斑駁之病徵、甚或全葉性黃化，罹病植株生長勢明顯衰弱。經採集病葉組織進行陰染、電子顯微鏡鏡檢可觀察到

直徑約 32 - 33 nm 大小之大量球形病毒顆粒。此外，約有一至三成疑似感染病毒之田間植株對 CarMV 抗血清產生專一性反應。目前臺灣尚無康乃馨受 CarMV 感染的文獻記載。本文就康乃馨上新分離而得之病毒株，經病毒顆粒形態與大小、寄主範圍、抗血清反應及鞘蛋白基因選殖定序以鑑定本分離株病毒。

材料與方法

病毒之分離及保存

2002 年 5 月於彰化縣田尾鄉採集葉片產生黃化或黃化斑駁之康乃馨葉片，首先以酵素連結免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法分析確認感染 CarMV 之材料，以 2 倍量 (w/v) 磷酸鉀緩衝液 (0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, 內含 0.01 M Na₂SO₃) 磨碎，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* Willd.) 葉片，約 2 - 3 日後所產生的壞疽斑點。經三次單斑分離之病毒分離株，再接種到五彩石竹 (*Dianthus chinensis* L.) 或奎藜供為試驗材料，部份材料則以甘油：磷酸緩衝液 (1:1) 保存於 -20°C 備用。

寄主範圍測定

取機械接種之初發病五彩石竹葉片，依前述方法接種至甜椒 (*Capsicum annuum* L. var. *Grossum* Seudt.)、辣椒 (*C. annuum* L. Red pepper)、紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reny)、奎藜 (*C. quinoa*)、曼陀蘿 (*Datura stramonium* L.)、康乃馨 (*D. caryophyllus* L.)、五彩石竹 (*D. chinensis* L.)、洋桔梗 (*Lisianthus russellianus* Don. Griseb.)、番茄 (*Lycopersicon esculentum* L. var. *lycopersicum*)、菸草 (*N. benthamiana*、*N. rustica* L.、*N. tabacum* var. *Vam-Hicks*) 及紅豆 (*Vigna angularis* Willd. Ohwi et Ohashi) 等植物，於溫控玻璃室 (25-28 °C) 觀察病徵。接種植物發病即予採樣；未發病者於連續觀察四週後採取接種葉，以夾層酵素連結免疫分析法⁽⁹⁾ (Double antibody sandwich-ELISA, DAS-ELISA) 確認病毒之感染。

病毒純化

病毒之純化係依陳等⁽³⁾ 純化 LNV 之方法進行。將機械接種之新鮮奎藜葉片以 2 倍量之磷酸鉀緩衝液 (0.5 M potassium phosphate buffer, 1% 2-mecaptoethanol, pH 7.5) 混合，並以均質機 (homogenizer) 打碎 2 分鐘，經雙層紗布過濾後，其濾液以氯仿 (chloroform) 及四氯化碳 (CCl₄) 淨化，並以 8% PEG 6000 (含 0.3 M NaCl) 沈降，加入 1% Triton X-100 攪拌淨化、離心後，取上層液置於 20% (w/v) 蔗糖溶液墊層上離心。所得沉降物製成懸浮液置於 10 -

40% 蔗糖密度梯度離心 2 小時 (Hitachi RPS 40T, 25,000 rpm)，吸起病毒沈降帶、再經 120,000 g 高速離心沈降 2 小時後，所得沈澱經懸浮即得純化病毒。

病毒外鞘蛋白分子量測定

病毒外鞘蛋白分子量測定係依照 Laemmli⁽¹⁸⁾ 之 SDS-PAGE 方法進行。純化之病毒加入解離緩衝液 (degrading buffer, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% Ficoll, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 12.5 ppm bromophenol blue) 於 65°C 熱處理 10 分鐘後進行膠體電泳分析 [12% 直立膠片 (polyacrylamide/bisacrylamide, 30:0.8, w/w), 長 9.5 cm × 寬 13 cm, 100 V, 1-2 小時]。

病毒物理性測定

以 0.1 M 磷酸鉀緩衝液 (potassium phosphate buffer, pH 7.0) 抽取接種之奎藜葉片之粗汁液以 10 倍系列稀釋，機械接種於奎藜以測定病毒之稀釋臨界點 (dilution end point)。另稀釋 100 倍之粗汁液用以測定病毒之耐熱性 (thermal inactivation point) 及生體外耐保存活性 (longevity in vitro)⁽¹¹⁾。

電子顯微鏡觀察

陰染法：感染病毒之罹病奎藜葉片組織粗汁液與 0.1% bacitracin (1:1) 混合，依 Christie 等人⁽⁸⁾ 之方法以銅網吸附前述之混合液，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，依前述方法同樣染色，以電子顯微鏡 (JEM-200CX, JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) 觀察病毒顆粒之形態，並拍照測量 100 顆病毒顆粒之直徑，計算病毒顆粒之平均大小。

超薄切片法：係以經機械接種發病之康乃馨“小可愛”、及五彩石竹等罹病葉片組織，分別以 2% 戊二醛 (glutaraldehyde) 及 1% 四氧化鐵 (osmium tetroxide) 進行前、後固定，再以酒精系列脫水，最後用 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% 醋酸鈾和檸檬酸鉛雙重染色後以電子顯微鏡 (JEM-200CX, JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) 觀察病組織之變化。

抗體來源

本試驗所使用之抗體包括購自 Advanced diagnostics International, LCC (ADI, LLC) 之 CarMV 及自備之海芋分離株 CarMV 多元抗體⁽⁷⁾。

雙向免疫擴散反應 (double immunodiffusion test)

以 PBS (15 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl) 配製 0.8% (w/v) 瓊脂溶液，取 12 ml 0.8% 瓊脂溶液於直徑九公分之培養皿使成瓊脂平板，置

於 4°C 保存。使用時以直徑 7 mm 之打孔器打洞(中央一，周圍六)，洞距 4.5 mm。中央洞注入 50 μ l 抗體 (CarMV 海芋分離株兔子抗體)，周圍洞分別加入不同供試抗原，於室溫下進行 18 - 36 小時之擴散反應，所使用之抗原包括康乃馨分離株純化病毒懸浮液 (10 μ g/ μ l) 及接種發病之奎藜葉片粗汁液，並以未接種之健康葉片粗汁液作為對照。

酵素連結免疫分析

夾層酵素連結免疫分析 (DAS-ELISA) 係依據 Clark & Adams (1977)⁽⁹⁾ 之方法進行，取 200 μ l CarMV 兔子抗血清 IgG (1:200) (ADI, LCC) 與塗覆緩衝液 (coating buffer) (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 0.02% NaN₃, pH 9.6) 之混合液置於微量盤之孔穴中，於 37°C 靜置一小時後以 PBST (137 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20, 2.7 mM KCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4) 洗三次，再加入以萃取緩衝液 (extraction buffer) [35 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2% PVP (M.W. 24000), 0.05% Tween 20, 2.7 mM KCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4] 研磨接種過之奎藜葉片粗汁液，37°C 下靜置一小時後以 PBST 洗三次，再加入以結合緩衝液 (conjugate buffer) [35 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2% PVP (M.W. 24,000), 0.05% Tween 20, 0.2% BSA, 1 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 2.7 mM KCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4] 稀釋 1000 倍之 CarMV IgG-alkaline phosphatase conjugate，37°C 下靜置反應一小時後再以 PBST 洗三次，最後每穴加入 200 μ l 以受質緩衝液 (substrate buffer) (9.7% diethanolamine, 0.2% NaN₃, pH 9.8) 配製之酵素基質 (*p*-nitrophenyl phosphate, 1 mg/mL) 溶液反應 10 - 60 分鐘後，每穴再加入 50 μ l 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，以健康對照之讀值的 3 倍作為正反應之判定依據。

總量核糖核酸 (total RNA) 之抽取

將接種之奎藜 100 - 400 mg 以液態氮研磨後，加入 500 μ l 緩衝液 (solution R, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) 以抽取總量核糖核酸⁽²²⁾，經酚/氯仿 (phenol/chloroform) (各 250 μ l) 處理，14,000 rpm (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R) 離心 5 分鐘，離心後取上層液加入等體積之 5 M LiCl (lithium chloride)，靜置於冰上至少 3 小時，以 14,000 rpm (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R) 離心 15 分鐘後，以 100 μ l 0.3 M NaOAc (sodium acetate) 溶解沉澱物後加入 250 μ l 100% 酒精，於 -80°C 冰箱靜置至少 20 分鐘，再以 14,000 rpm (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R) 離心 15 分鐘後，以 DEPC (diethylenepyrocarbonate) 處理過之無菌水溶解沉澱物即為總量核糖核酸，置於 -80°C 備用。

反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

依據已經發表之 CarMV 鞘蛋白基因 (coat protein) 核酸序列 (X02986、AJ309954) 來設計簡併式引子對 (degenerate primers)，以此引子對對接種之奎藜葉片組織所萃取出之總量核糖核酸作為模板，進行反轉錄聚合酶連鎖反應以增幅欲放大之核酸片段，上游引子 FJJ2002-44 之序列為 5'-CTCCATGGTCATGGAA(A/G)ATAAAGGAGAA-3'，下游引子 FJJ2002-45 之序列為 5'-GTGGATCCTGTACATCC TATAACAAC-3'。進行 RT-PCR 時，於總量 RNA 中加入 1 μ l 之 200 ng/ μ l 下游引子及 DEPC-treated water 混和成總體積 16 μ l，於 80 - 90°C 5 分鐘後置於冰上 5 分鐘，再利用反轉錄試劑組 (Epicentre, M-MLV RT-PCR kit) 加入 1 μ l (10 U/ μ l) M-MLV reverse transcriptase、2.5 μ l 10X reverse transcription buffer、2 μ l 2.5 mM dNTP、3 μ l 0.1 M DTT、及 0.5 μ l RNasin (40 U/ μ l) 於前混合液內，於 42°C 30 分鐘及 37°C 30 分鐘的條件下進行第一股 cDNA 之合成。之後取 5 μ l 上述之 cDNA、各 1 μ l 之 200 ng/ μ l 上游/下游引子對、Taq DNA polymerase 0.5 μ l (5.0 U/ μ l)、10 μ l 10X Taq reaction buffer [500 mM KCl, 17.5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1% Triton X-100]、2 μ l 2.5 mM dNTP 及無菌水使成 100 μ l 之反應液，將其混和均勻後於聚合酶連鎖反應機 (PTC-200, MJ Research Inc.) 進行 PCR 增幅反應。首先於 93°C 變性 (denature) 反應 5 分鐘後，再進行 34 個循環反應，每一循環反應之程序為 93°C 變性反應 1 分鐘，50°C 黏合 (annealing) 反應 1 分鐘，72°C 聚合反應 2 分鐘，最後再於 72°C 進行延長 (extension) 聚合反應 10 分鐘⁽¹⁷⁾。最後 PCR 反應產物以瓊脂膠體電泳法進行分析，其程序乃依一般標準分子生物技術進行⁽²³⁾。

病毒鞘蛋白基因之 cDNA 選殖及核酸序列解序與分析

RT-PCR 增幅產物經電泳分析後，需將 RT-PCR 增幅產物進行基因選殖並解序以確認此核酸片段為預期之核酸序列，因此進一步將 RT-PCR 所得的產物利用 TOPO TA 選殖套組 (TOPO TA cloning kit) (Invitrogen) 進行基因選殖，挑選出之選殖株，以小量質體抽取組套 (Mini-prep) (Viogene) 抽取質體 DNA，先以限制酵素 *EcoRI* 剪切，經 0.8% 膠體電泳分析，選取可能之選殖株，再利用 Sequence Version 2.0 DNA sequencing kit (Epicentre) 以 dideoxy-chain termination 方式⁽²⁴⁾ 進行解序，以進一步確認為正確之選殖株，而所得之核酸序列先以 NCBI 基因庫之 BLAST program，初步搜尋以了解是否為預期之病毒序列，並進一步利用 Clustal algorithm 之比對方式 (MegAlign program of DNASTAR software) 與國外已發表之 CarMV 之鞘蛋白基因序列進行比對分析。

結 果

田間發生概況

2002年4-5月間於彰化縣北斗鎮(I)、永靖鄉(II)及田尾鄉(III, IV)等鄉鎮共計於四個康乃馨園區分別採集疑似病毒感染所引起上方分蘖之心葉附近葉片產生黃化壞疽斑點或黃化斑駁等徵狀之葉片,各區所得樣品數供為測試者為27(I)、19(II)、34(III)及22(IV)個葉片樣品,於室內以CarMV抗血清進行DAS-ELISA測定分析,結果產生專一性免疫反應之樣品各區分別為7.4%(I)、21.1%(II)、17.6%(III)及36.4%(IV);另2003年6月間分別於北斗鎮(V)及田尾鄉(VI)栽培康乃馨雜交種“小可愛”之園區採集上方分蘖之心葉附近葉片產生如同上述徵狀之葉片樣品其數目為17(V)及31(VI)個樣品,經DAS-ELISA測定分析,所得結果產生專一性反應之樣品分別為29.4%(V)及34.4%(VI)。在田間此類病徵於康乃馨生育中、後期常發生,尤以田間管理較差之田區發生較為嚴重,病毒感染除影響植株開花及花形等品質外,並加速植株老化。

病徵及寄主範圍

田間栽種之康乃馨及康乃馨雜交品系“小可愛”於生育中、後期(四月份以後)部份植株較上方之分蘖,靠近心葉附近之葉片所出現包括葉片產生黃化斑駁或壞疽斑點、沿葉片中肋形成黃化斑駁條紋等病徵之植株,隨病勢進展而造成許多鄰近斑點融合成斑塊,甚至全葉性枯萎(圖一B)。以機械接種方法將康乃馨分離株回接康乃馨幼苗,約經4週於接種葉產生黃化斑點,發病葉表呈凹凸不平狀,葉緣有明顯內捲現象(圖一A)。

利用機械接種方法將康乃馨分離株接種於奎藜等十三種植物。結果病毒分離株可感染奎藜(*C. quinoa* Willd.)而引起壞疽斑點,感染紅藜(*C. amaranticolor* Coste & Reny)時接種葉片會引起黃化斑並轉變成壞疽斑;感染菸草(*Nicotiana rustica* L.及*N. tabacum* var. Vam-Hicks)均產生壞疽斑等病徵;感染五彩石竹(*D. chinensis* L.)引起黃化斑駁;感染康乃馨(*D. caryophyllus* L.)及菸草(*N. Benthamiana*)引起黃化現象,其中五彩石竹、康乃馨及菸草*N. benthamiana*呈系統性感染。但此分離株不能感染甜椒(*Capsicum annuum* L. var. Grossum Seudt.)、辣椒(*C. annuum* L. Red pepper)、曼陀羅(*Datura stramonium* L.)、洋桔梗(*Lisianthus russellianus* Don. Griseb)、番茄(*Lycopersicon esculentum* L. var. *lycopersicum*)及紅豆(*Vigna angularis* Willd. Ohwi et Ohashi)等測試植物。

病毒外鞘蛋白分子量

純化之病毒經由SDS-polyacrylamide膠體電泳分析結果顯示該病毒為具有單一鞘蛋白(coat protein)並與CarMV

海芋分離株鞘蛋白具有相同之電泳移動位置,估算分子量約為40 kDa(圖二)。

粗汁液之安定性

感染病毒分離株之奎藜葉片粗汁液稀釋至 10^{-6} 仍具有感染力,但 10^{-7} 則消失感染力。粗汁液於 4°C 及 25°C 保存至100天仍具有感染性(100天以後未試);粗汁液在 80°C 下處理10分鐘後其致病性明顯降低,於奎藜產生之壞疽斑點數減小, 90°C (10分鐘)仍具有感染性,但 95°C 及 100°C 處理之粗汁液則不具感染力。

電子顯微鏡觀察

罹病康乃馨粗汁液以2%醋酸鈾(uranyl acetate)陰染,於電子顯微鏡鏡檢可觀察到直徑約32-33 nm之球形病毒(圖三A)。罹病五彩石竹、康乃馨及康乃馨“小可愛”葉片之超薄切片可於葉肉細胞內觀察到病毒顆粒不規則分散於細胞質內(圖三B),在康乃馨“小可愛”之葉肉細胞之細胞質內偶可觀察到病毒呈類似結晶狀規則狀排列(圖三C)。

雙向免疫擴散反應

雙向免疫擴散反應試驗顯示康乃馨分離株純化懸浮液($A_{260} = 0.5 \text{ mg/ml}$)及粗汁液抗原均可與CarMV抗血清產生沈澱反應(圖四)。

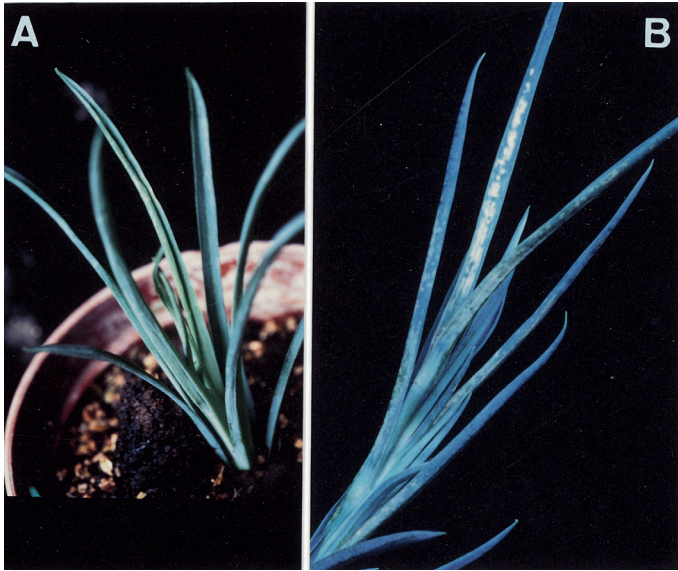
酵素聯結免疫反應

以CarMV(ADI, LLC)抗血清與本研究之康乃馨分離株接種於奎藜發病之粗汁液抗原進行DAS ELISA反應分析結果,當CarMV抗血清稀釋200倍,抗原稀釋至 10^{-5} 仍能產生專一性陽性反應(圖五)。

病毒鞘蛋白基因之選殖及核酸序列定序與分析

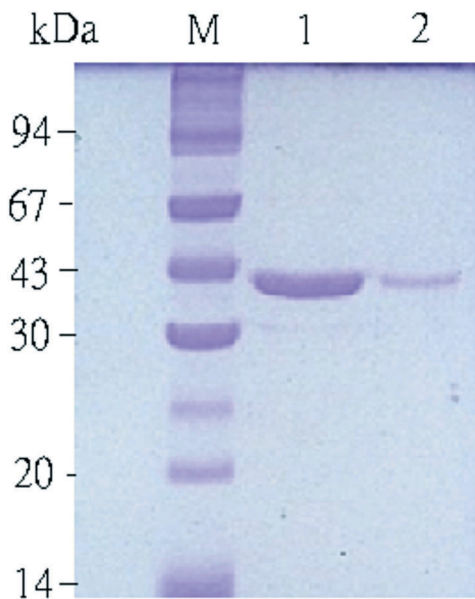
利用接種病毒之奎藜罹病葉所抽取之總量RNA為模板,以下游引子經反轉錄為cDNA後,再以此cDNA產物為模板進行聚合酶連鎖反應進一步放大增幅,所得之PCR產物以0.8% agarose膠體電泳分析,所得結果為增幅出約1 kb之DNA片段(圖六),該DNA片段大小與1.047 kb大小之CarMV鞘蛋白基因相符,而以健康奎藜所抽取之總量RNA為模板之負對照組經由反轉錄-聚合酶連鎖反應則無任何DNA片段被放大增幅出現(圖六)。

為證實RT-PCR所增幅約1 kb之DNA片段是否為CarMV之鞘蛋白基因,經TOPO TA選殖套組(Invitrogen, Carlsbad, CA)選殖後,以限制酶EcoRI剪切、0.8%膠體電泳分析,所得之選殖株核酸片段經解序後得1.047 kb之鞘蛋白基因(圖七),不含終止碼共對映產生一個約37.8 kDa含348胺基酸的蛋白,與SDS-PAGE的結果相符(圖二)。



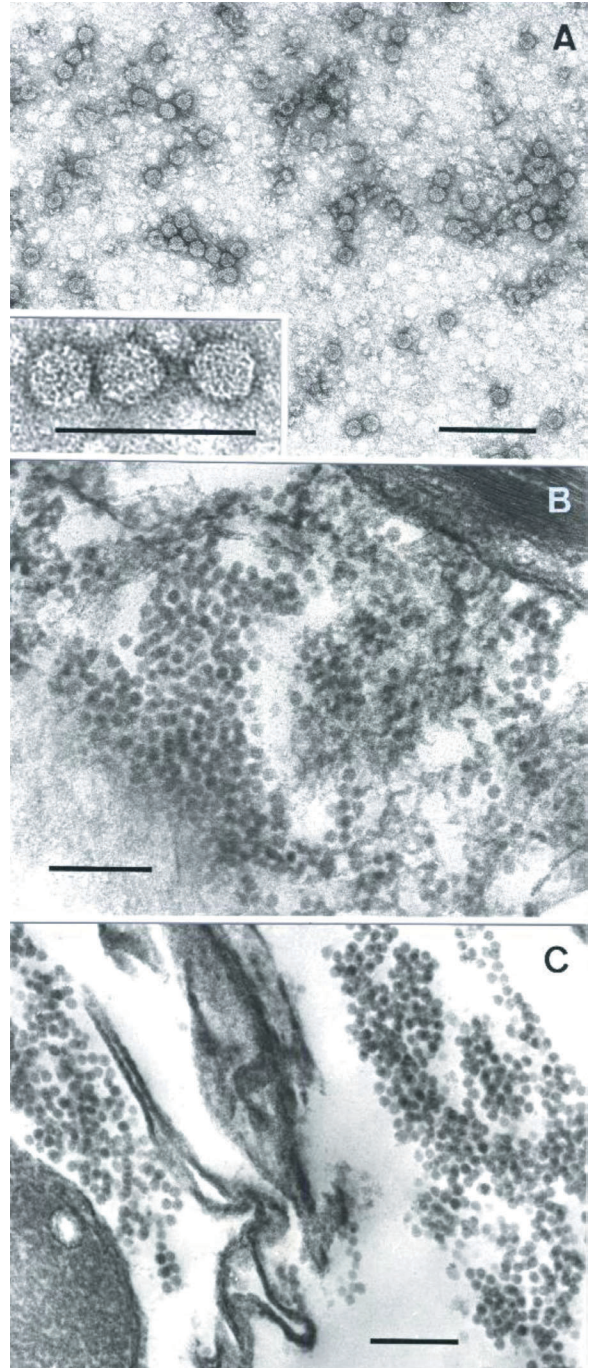
圖一、康乃馨斑駁病毒之病徵。(A) 機械接種 CarMV 康乃馨葉片產生皺縮及黃化壞疽斑點田間康乃馨 "小可愛" 葉片產生壞疽斑點或斑駁。(B) 田間康乃馨 "小可愛" 葉片產生壞疽斑點或斑駁。

Fig. 1. Symptoms induced by Taiwanese carnation isolate of *Carnation mottle virus* (CarMV)(A)Symptoms showing yellowing spots, crinkling and curling of leaves induced by mechanical inoculation of CarMV on *D. caryophyllus*. (B)Symptoms on *Dianthus caryophyllus* hybrid mini-carnation (Kooij Echo kgr, Holland) showing necrosis spots or yellowing mottle of leaves in the field.



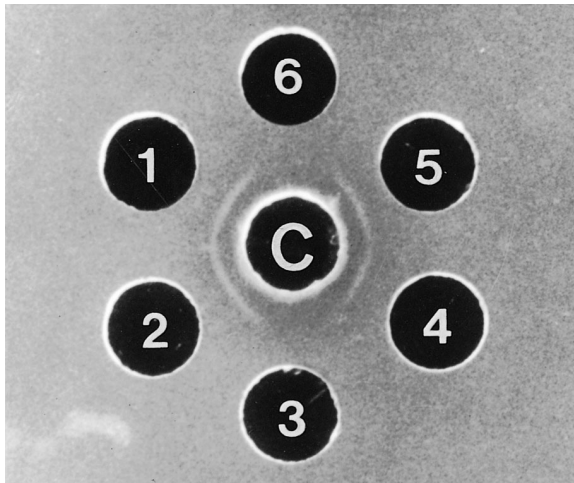
圖二、SDS-polyacrylamide 電泳分析 CarMV 康乃馨分離株外鞘蛋白。康乃馨分離株 (第一行)，海芋分離株 (第二行)，蛋白質分子量對照組 (M)。

Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of purified CarMV. Lane 1, CarMV isolated from carnation; lane 2, *Zantedeschia* isolate of CarMV; and lane M, protein molecular weight markers.



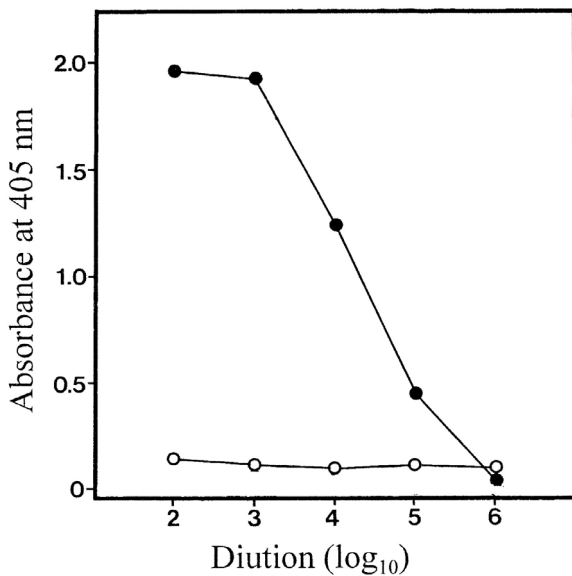
圖三、康乃馨斑駁病毒之電子顯微鏡圖。(A) 田間罹病康乃馨 "小可愛" 葉片粗汁液以 2% 醋酸鈉陰染可觀察到直徑約 32 - 33 nm 之病毒顆粒 (B) 罹病五彩石竹葉片超薄切片於葉肉細胞內可觀察到病毒顆粒不規則分散於細胞質內。(C) 罹病康乃馨 "小可愛" 葉片超薄切片於葉肉細胞之細胞質內偶可觀察到病毒呈規則狀排列。橫線= 500 nm

Fig. 3. Electron micrographs of 2% uranyl acetate stained (A) and ultrathin sections of CarMV in infected plant cells (B and C). (A) Leaf dip preparation of infected *Dianthus caryophyllus* hybrid mini-carnation (Kooij Echo kgr, Holland); (B) Mesophyll cell of infected *D. chinensis* showing virus-like particles in cytoplasm; (C) Mesophyll cell of infected *D. caryophyllus* (Kooij Echo kgr, Holland) showing virus-like particles in the cytoplasm. The bars represent 500 nm.



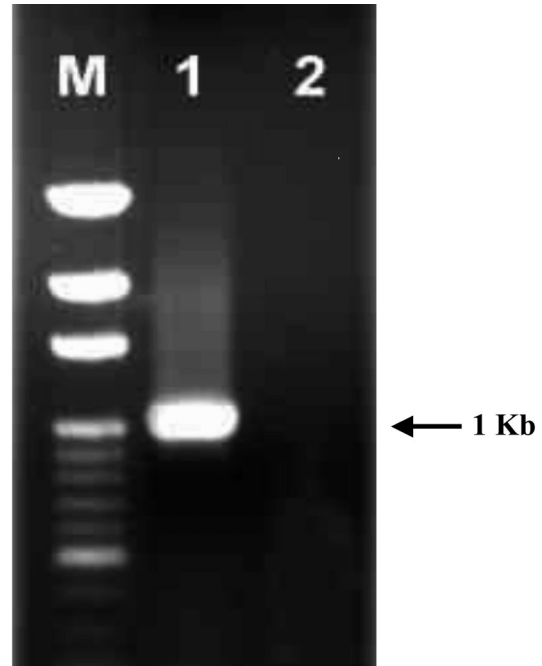
圖四、免疫擴散反應測定康乃馨斑駁病毒 (CarMV) 康乃馨分離株。海芋分離株兔子抗體 (C 穴)，感染康乃馨分離株之奎藜葉片粗汁液 (第 1, 4 穴)，健康奎藜葉片純化懸浮液對照 (第 3 穴)，純化康乃馨分離株 (第 2, 5 穴) 及健康奎藜葉片粗汁液對照 (第 6 穴)。

Fig. 4. Double immunodiffusion test of CarMV. Antisera against CarMV (well C); crude saps of CarMV infected *C. quinoa* leaves (wells 1 and 4), purified CarMV (wells 2 and 5), purified healthy *C. quinoa* preparation as a control using the protocol same as purified CarMV (well 3), and crude saps of healthy leaves of *C. quinoa* (well 6).



圖五、酵素連結免疫分析法測定康乃馨斑駁病毒 (CarMV) 康乃馨分離株。康乃馨斑駁病毒兔子抗血清用於夾層酵素連結免疫分析法 (DAS-ELISA)，感染 CarMV 之奎藜葉片粗汁液抗原 (●—)；對照健康奎藜葉片粗汁液 (○—)。

Fig. 5. Detection of CarMV by DAS-ELISA. Rabbits antibodies against CarMV (ADI, LLC) was used to react with crude saps of CarMV infected *C. quinoa* leaves (●—) and healthy crude saps of *C. quinoa* (○—). Antibodies (IgG) against CarMV, different dilutions of crude saps, anti-CarMV IgG-alkaline phosphatase conjugate and substrate of alkaline phosphatase were sequentially added. Readings were recorded 30 min after the addition of substrate (1 mg per milliliter).



圖六、電泳分析 RT-PCR 增幅 CarMV 康乃馨分離株鞘蛋白基因。

Fig. 6. Electrophoretic analysis of RT-PCR amplified product of the carnation isolate CarMV coat protein gene. A product of ~1 Kb was amplified from total RNA extracted from CarMV-infected *C. quinoa* leaves (lane 1) by RT-PCR. Lane M, Gen 1 Kb DNA ladder; lane 2, total RNA from healthy *C. quinoa*.

CarMV 之鞘蛋白基因核酸序列以 NCBI 之 BLAST program 進行搜尋、比對 GenBank 上已知之 CarMV 鞘蛋白基因及利用 Clustal algorithm (DNASTAR) 分析，該選殖株之鞘蛋白基因核酸序列與 CarMV 分離株鞘蛋白基因序列具有 95.6 - 97.9% 之序列相同度，其胺基酸序列則具有 98.0 - 99.1% 之相同度 (表一)。

討 論

臺灣中部地區栽培之康乃馨除能受已報告之康乃馨蝕環病毒 (CERV)⁽⁵⁾、康乃馨微嵌紋病毒 (CMMV)^(5,20) 及洋桔梗壞疽病毒 (LNV)⁽³⁾ 等三種病毒感染外，尚未發現其他康乃馨重要的病毒感染台灣地區所栽種之康乃馨⁽⁵⁾。本試驗於 2002 年 4 - 5 月間在彰化縣北斗鎮、永靖鄉及田尾鄉等鄉鎮根據黃化壞疽斑點或黃化斑駁等病徵所採集之病葉，經寄主植物、病毒形態、血清反應、核酸選殖及解序等試驗結果證實國內栽種之康乃馨亦可能受康乃馨斑駁病毒 (CarMV) 之感染。CarMV 為 *Tombusviridae*, *Carmovirus* 之代表種⁽²⁶⁾。其試驗寄主範圍廣，主要引起局部黃化斑點或壞疽斑點病徵，但自然寄主狹窄，侷限於石竹科 (*Caryophyllaceae*)⁽¹³⁾ 植物。CarMV 病毒性質安定，病毒之耐熱性可達 90°C；耐稀釋性為 10⁻⁵；於 20°C

ATGGAATAAAGGAGAAAAGATCGCGATGAATTCCACTGTGCAAACGTTGGCGCAGAAG 60
 M E N K G E K I A M N S T V Q T L A Q K
 GGGACAAGTTGGCCGTGAAGTTGGTGACAAGAGGGTGGGCCTCTCTGAGTACGAACCAG 120
 G D K L A V K L V T R G W A S L S T N Q
 AAGAGGAGAGCTGAAATGCTTGGTGGATACACTCCAGCGATCCTAGCCTTTACACCCCGA 180
 K R R A E M L A G Y T P A I L A F T P R
 CGACCACGGATGACGAACCCTCCTCCAAGAACCAGTAGGAATTCACCAGGACAAGCTGGA 240
 R P R M T N P P P R T S R N S P G Q A G
 AAGTCCATGACGATGAGTAAGACCGAACTACTATGCACCGTCAAAGGTACCACGGGTGTT 300
 K S M T M S K T E L L C T V K G T T G V
 ATCCCAAGCTTTGAAGACTGGGTGCTTTCCCCCGAAACGTAGCCGTCTTCCCTCAACTC 360
 I P S F E D W V V S P R N V A V F P Q L
 TCGCTGCTAGCGACGAACTTCAACAAGTATCGCATCACTGCGCTTACTGTGAAGTACTCA 420
 S L L A T N F N K Y R I T A L T V K Y S
 CCCGCGTGCAGTTTTGAGACAAATGGGAGGGTGGCTCTAGGATTCAACGATGACGCTTCG 480
 P A C S F E T N G R V A L G F N D D A S
 GACACACCGCCAACCACCAAGTTGGATTTTACGATCTGGGCAAACATGTGGAAACTGCT 540
 D T P P T T K V G F Y D L G K H V E T A
 GCACAGACAGCTAAGGATCTAGTGATACCAGTAGACGGCAAACCCGGTTCATCAGGGAC 600
 A Q T A K D L V I P V D G K T R F I R D
 TCGGCTAGTGATGATGCCAAACTAGTCGATTTTGGGCGAATAGTCTTGTCAACATACGGG 660
 S A S D D A K L V D F G R I V L S T Y G
 TTTGACAAGGCTGACACTGTGGTGGGCGAATTGTTTATACAGTACACGATTGTGCTGAGT 720
 F D K A D T V V G E L F I Q Y T I V L S
 GACCCAACCAAGACGGCCAAAATTTACAGGCAAGTAACGATAAGGTGTGCGACGGACCA 780
 D P T K T A K I S Q A S N D K V S D G P
 ACGTATGTGGTCCCTTCGGTTAATGGCAACGAGCTACAATTAAGAGTGGTAGCCGCTGGG 840
 T Y V V P S V N G N E L Q L R V V A A G
 AAATGGTGCATTATAGTGCGGGTACGGTTGAAGGAGGCTTCACCAAACCCACACTTATT 900
 K W C I I V R G T V E G G F T K P T L I
 GGGCCGGGAATCAGCGGTGATGTGGACTATGAAAGTGCCAGACCTATCGCCATTTGTGAG 960
 G P G I S G D V D Y E S A R P I A I C E
 TTGGTGACACAAATGGAGGGCCAGATATTGAAGATCACCAAGACCTCAGCAGAACAACCA 1020
 L V T Q M E G Q I L K I T K T S A E Q P
 CTCCAATGGGTTGTTTATAGGATGTGA 1047
 L Q W V V Y R M .

圖七、CarMV 鞘蛋白基因之核酸及胺基酸序列

Fig. 7. The nucleotide sequence of CarMV coat protein gene and its deduced amino acid. The GenBank accession number for the sequence reported here is AY383566.

表一、康乃馨斑駁病毒 (CarMV) 康乃馨分離株之鞘蛋白基因與已發表 CarMV 序列之比較

Table 1. Comparison of nucleotide and amino acid sequences of the coat protein gene of CarMV isolated from carnation in Taiwan with those of CarMV isolates available in GenBank

Virus isolate	Accession No.	Source	Nucleotide identity (%)	Amino acid identity (%)
CarMV	X02986		97.9	98.9
CarMV it-2	AJ309502	Italy	97.6	99.1
CarMV nl-2	AJ309497	Netherlands	97.6	99.1
CarMV isr-2	AJ309501	Israel	97.5	98.6
CarMV sp-m	AJ309509	Spain	97.4	98.6
CarMV Lord	AJ309508	Spain	97.3	98.9
CarMV Dixie	AJ304989		97.2	98.3
CarMV	AJ549954		97.0	98.0
CarMV sp-2	AJ309504	Spain	97.0	98.9
CarMV it-1	AJ309499	Italy	97.0	99.1
CarMV-YN	AF173879		97.0	98.3
CarMV sp-4	AJ309506	Spain	96.9	98.6
CarMV sp-3	AJ309505	Spain	96.9	98.6
CarMV sp-1	AJ309503	Spain	96.9	98.6
CarMV fr	AJ309494	France	96.9	98.6
CarMV Col	AJ309493	Colombia	96.9	98.6
CarMV usa-2	AJ309512	USA.	96.8	98.3
CarMV jap	AJ309495	Japan	96.8	98.3
CarMV Aus	AJ309492	Australia	96.8	98.3
CarMV sp-s	AJ309510	Spain	96.0	98.3
CarMV sp-i	AJ309507	Spain	95.9	98.3
CarMV	AF192772	China:Shanghai	95.8	98.3
CarMV	AJ489479		95.6	98.0

可保存 70 天病毒仍具有病原性；罹病西洋石竹 (*Dianthus barbatus*) 汁液冷凍真空乾燥於室溫保存 10 年仍具有致病性^(12,13)，本試驗測試 CarMV 康乃馨分離株病毒之安定性所得結果與前述報告相似。利用 SDS-polyacrylamide 膠體電泳分析病毒外鞘蛋白分子量，結果顯示 CarMV 康乃馨分離株具有約 40 kDa 大小相同之鞘蛋白分子量。而以陰染法或電子顯微鏡觀察罹病葉片之超薄切片得類似 CarMV 約 32 - 33 nm 的球狀病毒顆粒散佈於葉肉細胞之細胞質中；再利用雙向免疫擴散反應發現 CarMV 康乃馨分離株純化懸浮液及粗汁液抗原均與 CarMV 抗血清產生專一性沈澱反應。此外以夾層酵素連結免疫分析法分析亦發現康乃馨分離株接種於奎藜發病之粗汁液抗原與 CarMV 抗血清產生專一性之正反應，顯示此一康乃馨病毒應為 CarMV 的一個分離株。將此新分離之康乃馨病毒進一步以 CarMV 之鞘蛋白基因專一性引子對進行反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 增幅其鞘蛋白基因再經選殖定序後發現所得之選殖株不論是核酸序列或是胺基酸序列與 NCBI 之 GenBank 目前已發表之 CarMV 核酸序列及胺基酸序列經比對後顯示其相似度分別高達 95.6 - 97.9% 及 98.0 - 99.1%，因此鑑定引起台灣康乃馨黃化壞疽斑點或黃化斑

駁等病徵之病原為 CarMV。全球主要康乃馨產地如歐洲、日本、澳洲、伊朗、以色列及美國等地區皆已有康乃馨感染 CarMV 之相關報導^(10,21)，但截至目前為止並無正式的學術期刊報告或紀錄顯示台灣之康乃馨曾遭 CarMV 感染危害，本研究利用抗血清反應、電子顯微鏡及鞘蛋白基因的選殖及解序，判定引起本省康乃馨黃化壞疽斑點或黃化斑駁等病徵之病原為 CarMV，此一研究報告為 CarMV 病毒在台灣感染康乃馨之第一個報告。根據田間調查彰化縣栽培之康乃馨生育初、中期甚少發生 CarMV 感染之徵狀，但 5 - 6 月採花盛期以後 CarMV 感染之比例在經採集之疑似病株中佔 1 - 3 成。由於該地區所栽種之種苗多由荷蘭進口，因此 CarMV 究竟是本土性病毒病害或是經由種苗進口而侵入，值得進一步追蹤查明。由於在實驗室 CarMV 極容易以機械方法傳播，在田間病毒可藉由手的污染、修剪，尤其是切花作業而傳播^(10,13)。在病害預防方面，由於感植株心葉莖頂病毒濃度低，可以不需經由熱處理而進行莖頂組織培養是一項有效獲得健康種苗之方法⁽¹³⁾。因此在康乃馨田間栽培管理作業中，由於切花作業的需要，病毒經由切花器具而傳播的機率頗高，值得花農注意，以期減少感染。

誌謝

本試驗承行政院農委會動植物防疫檢疫局[92 農科-1.8.1-檢-B3 (2)]計畫經費補助，特誌謝忱。

引用文獻

1. 行政院農業委員會. 2002. 九一年農業統計年報. 行政院農業委員會出版. 452 pp。
2. 柯南靖. 1989. 簡易植物病毒診斷圖鑑. 臺灣省政府農林廳補助出版. 109 pp。
3. 陳慶忠、陳煜焜、柯文華、徐惠迪. 2002. 康乃馨上洋桔梗壞疽病毒之分離與鑑定. 植病會刊11:137-146。
4. 黃敏展. 1985. 現代香石竹切花生產技術. 八萬農業建設大軍訓練教材. 行政院農業委員會、臺灣省政府農林廳編印. 62 pp。
5. 張清安. 1994. 台灣花卉病毒病毒. 台灣花卉病蟲害研討會專刊p.213-224。
6. Chang, C.-H. 2003. Complete genome sequence and genetic organization of *Lisianthus necrosis virus*. Master thesis, Department of Plant Pathology, Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, 70 pp.
7. Chen, C. C., Ko, W. F., Jan, F. J., Lin, C. Y., and Hsu, H. T. 2002. Characterization of *Carnation mottle carmovirus* isolated from calla lily (*Zantedeschia* spp.). Plant Pathol. Bull.11: 242-243.
8. Christie, S. R., Purcifull, D. E., Crawford, W. E., and Ahmed, N. A. 1987. Electronmicroscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissue samples with appendices on negative staining techniques. Fla. Agric. Exp. Stn. Bull. No. 872, 45 pp.
9. Clark, M. F. and A. N. Adams.1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 68: 1801-1811.
10. Danesh, D., and Gavvani, A. M. 1979. Occurrence of carnation mottle virus on carnation in Iran. Plant Dis. Rept. 63: 940-944.
11. Dijkstra, J., and de Jager, C. P. 1998. Practical Plant Virology: Protocols and Exercises. p.277-284. Springer-Verlag Berlin; Heidelberg.
12. Gallitelli, D., Castellano, M. A., Difrancio, 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.
13. Hollings, M. and Stone, O. M. 1970. Carnation mottle virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 7.
14. Hollings, M., Stone, O. M., and Bouttell, G. C. 1970. Carnation italian ringspot virus. Ann. Appl. Biol. 65: 299-309.
15. Hollings, M., Stone, O. M., Atkey, P. T. and Barton, R. J. 1977. Investigations on carnation viruses. IV. Carnation vein mottle virus. Ann. Appl. Biol. 85:59-70.
16. Inouye, T. 1974. Carnation necrotic fleck virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 136.
17. Jan, F. J., Wu, Z. B., Kuo, A. J., Zheng, Y. X., Chang, H. H., Su, C. C., and Yang, T. S. 2003. Detection of *Apple chlorotic leaf spot* and *Apple stem grooving virus* by the method of reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Pathol. Bull. 12: 12-18.
18. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
19. Lawson, R. H., and Civerolo, E. L. 1977. Carnation etched ring virus. CMI/AABDescriptions of Plant Viruses No. 182.
20. Liang, Y. C., and Ko, N. J. 1992. Host range and cytology of a virus causing mild mosaic on carnation. Plant Pathol. Bull. 1: 184-189.
21. Lisa, V. 1995. Carnation. p.385-395. In: Loebenstein, G., Lawson, R. H., and Brunt, A. A. Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops. John Wiley & Sons. West Sussex.
22. Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgenson, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2: 279-289.
23. Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
24. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 571-579.
25. Tremaine, J. H., and Dodds, J. A. 1985. Carnation ringspot virus. CMI/AABDescription of Plant Viruses No. 308.
26. Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. 2000. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division, International Union of Microbiological Societies. Academic Press.
27. Wetter, C. 1971. Carnation latent virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 61.

ABSTRACT

Chen, C. C.¹, Lin, C. Y.², Ko, W. F.¹, and Jan, F. J.^{2,3}. 2003. Isolation and characterization of *Carnation mottle virus* from carnation. *Plant Pathol. Bull.* 12:199-208. (¹ Taichung District Agriculture Improvement Station, Tatsuan, Changhua, Taiwan; ² Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ³ Corresponding author, E-mail: fjjan@nchu.edu.tw, Fax:+886-4-22854145)

Virus cultures were isolated from leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and mini-carnation [*Dianthus caryophyllus* hybrid Kooij (Echo kgr)] showing viral disease-like symptoms of yellow necrotic spots and yellow mottle beginning on upper leaves in the fields in central Taiwan. Isometric particles about 32-33 nm in diameter were found in crude saps of diseased tissues. Similar particles were also observed in the cytoplasm of the mesophyll cell in ultrathin sections prepared from infected *D. caryophyllus* and *D. chinensis*. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the virus contains one structural polypeptide about 40 kDa. Serological tests with double immunodiffusion test and double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay showed that the virus reacted positively with an antiserum prepared against *Carnation mottle virus* (CarMV). The coat protein (CP) gene of the virus was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), cloned, and sequenced using primers designed from a conserved sequence of CarMV. Comparisons of the 1047-nucleotide CP gene with those of 23 CarMV isolates available in GenBank showed that the virus shared 95.6-97.9% nucleotide identity and 98.0-99.1% amino acid identity. Our results demonstrate that the virus infecting carnation is an isolate of CarMV. This is the first report of CarMV infecting carnation in Taiwan.

Keywords: carnation, *Carnation mottle virus*, CarMV, identification