

引起茼蒿白化嵌紋病之蕪菁嵌紋病毒分離株之寄主反應、細胞學特性及血清學性狀

陳翠妙¹ 陳煜焜¹ 陳泳紀¹ 葉錫東^{1,2}

1. 台中市 中興大學植物病理學系

2. 連絡作者：電子郵件 sdye@nchu.edu.tw；傳真 04-2852501

接受日期：中華民國88年4月1日

摘 要

陳翠妙、陳煜焜、陳泳紀、葉錫東. 1999. 引起茼蒿白化嵌紋病之蕪菁嵌紋病毒分離株之寄主反應、細胞學特性及血清學性狀. 植病會刊 8:73-82.

茼蒿白化嵌紋病毒 (garland chrysanthemum albinic mosaic virus, GCV-Am) 造成茼蒿矮化，葉片嵌紋，白化或裂葉等病徵，為一種長絲狀病毒，大小約 775 × 13 nm，經鑑定屬於蕪菁嵌紋病毒 (turnip mosaic virus, TuMV) 之一分離株。為釐清 GCV-Am 與其他 TuMV 系統之關係，本研究特將其與 TuMV 之 C1, C2, C3, C4 及 C5 病毒系統的寄主反應、細胞學特性及血清性狀做一詳細比對。以 GCV-Am 接種四種白菜鑑別品種 (*B. campestris ssp. pekinensis* cultivars)：Tropical Delight, Crusader, PI418957 及 PI419105，發現均可感染產生病徵，與本省 TuMV-C5 系統特性相似。由細胞學特性之比較中，發現 GCV-Am 與其他 TuMV 系統均可在細胞質內產生圓柱狀內含體，形態包括風車狀、薄層狀、卷軸狀及束狀內含體。為釐清 GCV-Am 與各系統間之相關性，分別利用本省五種 TuMV 病毒系統 (C1、C2、C3、C4 及 C5) 及 GCV-Am 病毒與 GCV-Am 抗血清、台灣蘿蔔分離株 TuMV-R 抗血清及德國甘藍分離株 TuMV-B 抗血清進行免疫雙向擴散反應，結果均可產生親和性之沈澱帶；而以間接酵素連結免疫吸附法測試，此六種抗原與 GCV-Am 之抗血清及德國 TuMV-B 抗血清之反應強度均相近。西方轉漬法測試亦均有相同之反應條帶且六者之鞘蛋白分子量均為 35kDa。本研究之結果顯示 GCV-Am 與五種 TuMV 系統間無法以血清學或細胞學等方法明顯區分，但依寄主特性顯示 GCV-Am 屬於 TuMV-C5 系統。

關鍵詞：茼蒿白化嵌紋病、蕪菁嵌紋病毒、血清學、細胞學

緒 言

蕪菁嵌紋病毒 (turnip mosaic virus, TuMV) 感染十字花科植物，在亞洲被認為是感染十字花科植物最重要的病毒^(2,8,11,25)。TuMV 屬於 *Potyvirus* 屬，病毒顆粒為長絲狀，大小約 680 ~ 784 nm，可經由機械傳播及蚜蟲以非永續性方式傳播，但不經由種子傳播^(20,27)。TuMV 廣泛分佈在世界各地，在台灣 TuMV 亦危害蘿蔔造成嚴重損失^(1,2,11)，陳等於台中新社地區發現茼蒿植株葉片出現白化、嵌紋、裂葉及植株矮化等病徵，分離之病原為長絲狀病毒，而將之命名為茼蒿白化嵌紋病毒 (garland chrysanthemum albinic mosaic virus, GCV-Am)，此病毒大小約 775 × 13 nm，可藉由機械接種系統感染油菜、青江白菜、白菜、蘿蔔、和菠菜等，而在奎藜、紅藜、千日紅和菸草等形成局部壞疽病斑，且在罹病細胞內形成板層狀或捲軸狀聚合體之內含體，並可

藉由蚜蟲傳播，其鞘蛋白分子量約 37 kDa，經由血清學特性等反應，顯示其與 TuMV 有不可區分之血清類緣關係，綜上述之特性，證實其為 TuMV 之一分離株-GCV-Am，亦證實茼蒿為 TuMV 之新寄主植物⁽³⁾。由於 TuMV 寄主範圍廣泛，依其感染十字花科寄主反應之病徵而區分之分類系統繁雜，目前較被廣泛接受之分類系統，是利用 TuMV 在不同白菜鑑別品種之反應區分為 C1、C2、C3、C4 等病毒系統^(22,23)，本省除可發現上述 4 種系統外另存在一新的 C5 系統⁽¹²⁾。但陳等所使用之供試植物品種與該分類系統未盡相同，顯示之證據仍不足以界定 GCV-Am 與 TuMV 各系統間之相關性，因此本研究嘗試利用白菜鑑別品種反應、細胞學及血清學之方法比較 GCV-Am 與 TuMV 各系統間之異同。以釐清危害茼蒿之 GCV-Am 分離株所屬之 TuMV 系統。

材料與方法

病毒之來源與系統測定

供試病毒分離株係為陳等保存之自台中縣新社鄉田間採回葉片具白化、嵌紋及裂葉等病徵之茼蒿葉片，本研究使用之接種源製備與保存如該文所述⁽³⁾，以磷酸緩衝溶液(0.1 M K₂HPO₄, 1 mM EDTA, 0.1% thioglycolic acid, pH 7.4) 磨碎，取其汁液機械接種於撒有金剛砂(400目)之奎藜(*Chenopodium quinoa* Wild.) 葉片上，7~10天後切取接種葉上之黃色壞疽單斑，以同法再機械接種於奎藜，經三次單斑分離後，接種於茼蒿和油菜，供為本試驗之接種源；病毒之保存以無水氯化鈣乾燥茼蒿病葉，保存於-40℃，或直接將病葉保存於-80℃中。蕪菁嵌紋病毒(TuMV)之C1、C2、C3、C4及C5各系統由亞洲蔬菜中心Dr. S. K. Green提供，也以上述方法繁殖保存。

將GCV-Am與TuMV五個系統之病毒依前述方法接種於由亞洲蔬菜中心Dr. S. K. Green提供之鑑別TuMV系統的4種白菜品種或品系(*Brassica campestris* subsp. *pekinensis* cultivars)：Tropical Delight, Crusader, PI418957及PI419105，置於溫室隔離觀察病徵之表現，並配合電子顯微鏡陰染檢查，以確定感染病毒與否。

電子顯微鏡觀察

罹病植物油菜、芥菜及奎藜之組織及健康植物之組織以刀片切成約1.5×1.5 mm之大小，置於含2.5%戊二醛(glutaraldehyde)之磷酸緩衝液(pH 7.0)於4℃下行前固定後，以0.1 M磷酸緩衝液振盪水洗四次，然後以1%四氧化錳(OsO₄)行後固定，再以酒精系列脫水。脫水後之組織塊移入100%酒精和LR White樹脂混合液(1:1, v/v)進行滲透，隔天以100% LR White樹脂置換，最後將材料放入白明膠膠囊(gelatin capsule)中，以LR White包埋。滲透完全後置於60℃烘箱28小時，使LR White聚合硬化⁽¹⁶⁾。硬化後之材料以鑽石刀在超薄切片機(Reichert-Jung Ultracut-E)切取厚度約60~90 nm的切片，粘貼於覆有Formvar支持膜並經碳素補強的銅網上，然後以2%醋酸鈾(uranyl acetate)與檸檬酸鉛(lead citrate)進行雙重染色，在電子顯微鏡(JOEL JEM-1200 EX II)下，以80 kV觀察。

病毒鞘蛋白分子量測定

經過三次單斑分離後的病毒繁殖於芥菜，經氯化鈉密度梯度離心純化病毒⁽³⁾，依Laemmli⁽¹⁸⁾之方法利用平板凝膠電泳(slab gel electrophoresis)測定病毒鞘蛋白分子量。純化之病毒懸浮於2X解離緩衝液煮沸3分鐘後，每行注入10 µl，於13%凝膠中通電100伏特，1.5小時。分子量之決定係以標記蛋白(Pharmacia Biotechnology)為依據，分別含磷酸化酵素b(phosphorylase b, 94 K)，胎牛血清

(bovine serum albumin, 67 K)，卵蛋白(ovalbumin, 43 K)，碳酸酐酶(carbonic anhydrase, 30 K)，胰蛋白酶抑制劑(soybean trypsin inhibitor, 20 K)及 α -乳白蛋白(α -lactalbumin, 14 K)。

病毒抗血清來源

本實驗所使用之GCV-Am抗血清是經純化之病毒顆粒以肌肉注射方式連續施打於紐西蘭白兔後，自耳朵靜脈採血製備而成，病毒純化之步驟與抗血清製作方法已於過去之報告中述明⁽³⁾。而TuMV抗血清來源則分別為台灣省農試所張清安博士提供之蘿蔔分離株(簡稱為TuMV-R)抗血清與亞洲蔬菜中心Dr. Green提供之德國甘藍黑色輪斑系統(cabbage blackring strain, 簡稱為TuMV-B)抗血清。GCV-Am抗血清與上述二種不同來源之TuMV抗血清之比較是以SDS-瓊脂雙向擴散法行之⁽²⁶⁾：以磷酸緩衝溶液配製0.85%瓊脂溶液倒入塑膠培養皿，凝固後以打孔器打孔，每孔直徑5 mm，相鄰兩孔距離為4.5 mm。GCV-Am感染之芥菜粗汁液作為反應之抗原。抗血清則以PBS二倍系列稀釋使用，並以免疫前之正常血清做為對照。培養皿放入保鮮盒中保持濕度，置於室溫下反應16-36小時後觀察。另外，亦比較GCV-Am抗血清與台灣TuMV5個系統之間的血清關係。所使用之TuMV各系統抗原係新鮮芥菜病葉1 g加1 ml蒸餾水研磨，再加入1 ml之3% SDS混合後，經紗布過濾所得之病毒粗汁液，抗血清則使用GCV-Am抗血清。

西方轉漬反應

純化之病毒鞘蛋白經SDS-PAGE電泳分離後，取下膠體，放在轉漬槽(Bio-Rad mini electroblot cell)內，以100 V通電1.5小時，使膠體上的蛋白轉漬於硝化纖維膜(NC paper)上，復以TSW buffer進行反應1小時，再移至稀釋3000倍之GCV-Am或TuMV-B抗血清中作用，再以鹼性磷酸酶結合之山羊抗兔免疫球蛋白G(alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG, Sigma)稀釋5000倍進行免疫反應；然後以呈色基質NBT(nitroblue tetrazolium)及BCIP(bromochloroindoyl phosphate)進行呈色反應⁽¹⁰⁾。

間接酵素連結免疫分析

依Koenig⁽¹⁷⁾之方法，進行間接酵素連結免疫分析。健康與罹病芥菜植物葉片以10倍量(W/V)之黏附緩衝液(coating buffer)研磨，並經10倍系列稀釋於微量盤之孔穴中。於37℃靜置2小時，以PBST水洗三次並加入2%胎牛血清(bovine serum albumin, BSA)，於37℃反應1小時後，分別加入稀釋1000倍之GCV-Am與TuMV-B抗血清中作用，37℃靜置1小時，水洗後加入稀釋5000倍之鹼性磷酸酶結合之山羊抗兔免疫球蛋白反應，再加入鹼性磷酸酶

素基質 (-nitrophenyl phosphate disodium, Sigma, 1mg/ml) 溶液，反應30 ~ 60分鐘，加入3 M NaOH停止反應，並以ELISA測讀儀 (Microplate Reader UV MR 700, Dynatech) 測讀在波長405 nm之吸收值。

結 果

病徵與寄主反應

GCV-Am機械接種於茼蒿表現出與田間類似之白化、裂葉等病徵。而接種於四種白菜鑑別品種則分別表現不同的病徵，其中PI419105葉片出現嵌紋、皺縮，且葉片組織散生綠島 (green islands) 狀斑塊 (圖1, A)；Crusader 品種之葉片則是出現濃綠與黃色參雜不均勻之嵌紋病徵，且葉片有輕微皺縮 (圖1, B)，PI418957品種之葉片略有萎凋下垂之現象且葉肉有小突起 (圖1, C)，取此突起處之葉肉以電子顯微鏡陰染檢查可見長絲狀病毒顆粒。而病徵最為明顯的是Tropical Delight品種，接種約10天後病葉呈現嚴重嵌紋、皺縮，且葉肉出現凹凸不平之畸形病徵，沿葉脈還有維管束壞疽 (necrosis) 的褐色病徵 (圖1, D)。

GCV-Am與TuMV五個系統C1、C2、C3、C4及C5對於四種白菜鑑別品種接種反應之結果列於表1，可見GCV-

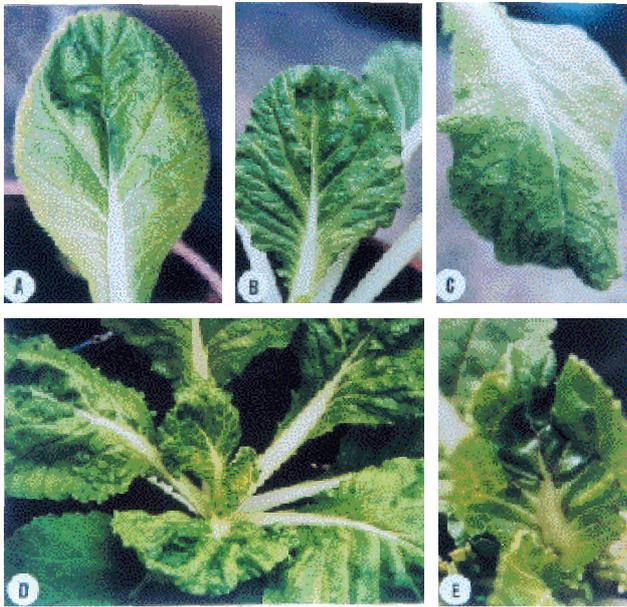
Am與C5系統之反應相似，唯在PI418957之病徵表現略有差異，GCV-Am並無葉脈透化 (vein clearing)，僅有輕微嵌紋及葉肉突起。GCV-Am與C5系統均可感染四種白菜鑑別品種，配合電子顯微鏡陰染鏡檢可見病毒顆粒聚集而確定感染。另外，C1、C2、C3、C4系統對測試植物的罹病反應則不相同，其中C1系統只感染PI419105與Crusader品種；C2系統只感染Tropical Delight品種；C3系統只感染

表一、茼蒿白化嵌紋病毒 (GCV-Am) 與蕪菁嵌紋病毒 (TuMV) C1-C5五個系統對四種白菜鑑別品種之接種反應

Table 1. Comparison of host reactions of five strains of turnip mosaic virus (TuMV C1, C2, C3, C4 and C5) and GCV-Am isolate on four cultivars of *Brassica campestris* subsp. *pekinensis* selected for strain differentiation

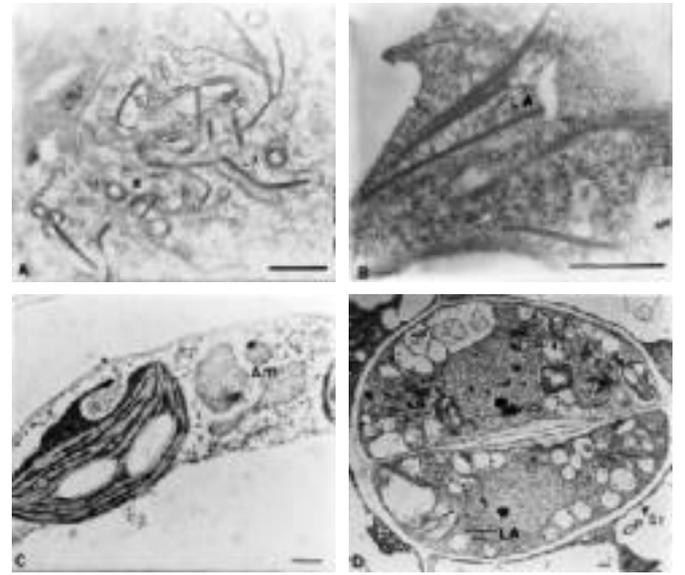
cultivar	Reaction ¹					GCV-Am
	C1	C2	C3	C4	C5	
Tropical Delight	-	+	+	+	+	+
Crusader	+	-	+	+	+	+
PI418957	-	-	-	-	+	+
PI419105	+	-	-	+	+	+

¹ - : no infection, + : susceptible with systemic symptoms and with virus infection detected by electron microscopy



圖一、茼蒿白化嵌紋病毒感染不同白菜鑑別品種之病徵表現。A與B：PI 419105與Crusader 病葉分別產生嵌紋與皺縮，C：PI418957葉肉產生隆起病徵，D與E：Tropical Delight病葉產生嵌紋和壞疽病徵。

Fig. 1. Symptoms of GCV-Am on *Brassica campestris* subsp. *pekinensis* cultivars selected for strain differentiation. Mosaic on cultivar PI 419105 (A), savoy on Crusader (B), rugosity on PI418957 (C), and mosaic (D) and systemic necrosis (E) on Tropical Delight.



圖二、油菜感染茼蒿白化嵌紋病毒罹病組織超薄切片之電顯圖。LA為薄層狀內含體，S為捲軸狀內含體，Am為不定形內含體，St為氣孔之保衛細胞。

Fig. 2. Electron micrographs of ultrathin sections of leaves of rape infected with GCV-Am. Bar = 500nm. A and B, cross sections of cytoplasmic inclusions in the form of laminated aggregates (LA) and scrolls (S). C, amorphous cytoplasmic inclusions (Am). D, laminated aggregates (LA) were also found in stromata cells.

Tropical Delight與Crusader品種；C4系統則感染Tropical Delight、Crusader與PI419105等三種品種。

GCV-Am感染後植物細胞內組織學之變化

GCV-Am感染之油菜及芥菜等不同寄主之病組織超薄切片中，在細胞質可觀察到馬鈴薯Y群病毒特有之圓柱狀内含體 (cylindrical inclusions)，其形態包括薄層狀 (laminated aggregates) 及卷軸狀 (scrolls) (圖2, A及B)，有時亦可觀察到不定形内含體 (amorphous inclusions) (圖2, C)，在保衛細胞中亦可見薄層狀内含體存在 (圖2, D)。被感染的細胞中可見到葉綠體與粒線體被破壞，葉綠餅 (grana) 及板層 (lamella) 變形退化 (圖3, A及B)，於感染初期，常觀察到内含體與細胞膜呈垂直狀連接，為束狀内含體 (bundle inclusion) (圖3, C)，而粒線體內的脊 (cristae) 多半消失，內容空虛，但膜仍存在 (圖3, D)。TuMV-C1至C5品系之芥菜病組織切片中亦可見到葉綠體變形、澱粉粒增多及粒線體被破壞的情形。而健康植株細胞中則未觀察到上述之内含體或組織病變情形。

此外亦針對感染TuMV-C1、C2、C3、C4與C5五個品系之奎葵病組織進行超薄切片，同樣可觀察到圓柱狀内含體出現在細胞質內。包括風車狀、薄層狀及卷軸狀 (圖4)。在TuMV-C3的切片中則觀察到類似病毒集團的絲狀群集體 (fibrous mass, FM)，但並無與細胞膜相連，而是與液胞膜 (tonoplast) 相連，且與薄層狀内含體呈垂直或平行排列 (圖4, C)。TuMV-C4的切片中可見薄層狀内含體頂端略

為彎曲，有些則捲曲後變成卷軸狀内含體 (圖4, D)。TuMV-C5超薄切片中可見風車狀内含體之縱切面與捲軸狀内含體之橫切面 (圖4, E)。而在GCV-Am之奎葵組織切片中亦可見薄層狀及卷軸狀内含體 (圖4, F)

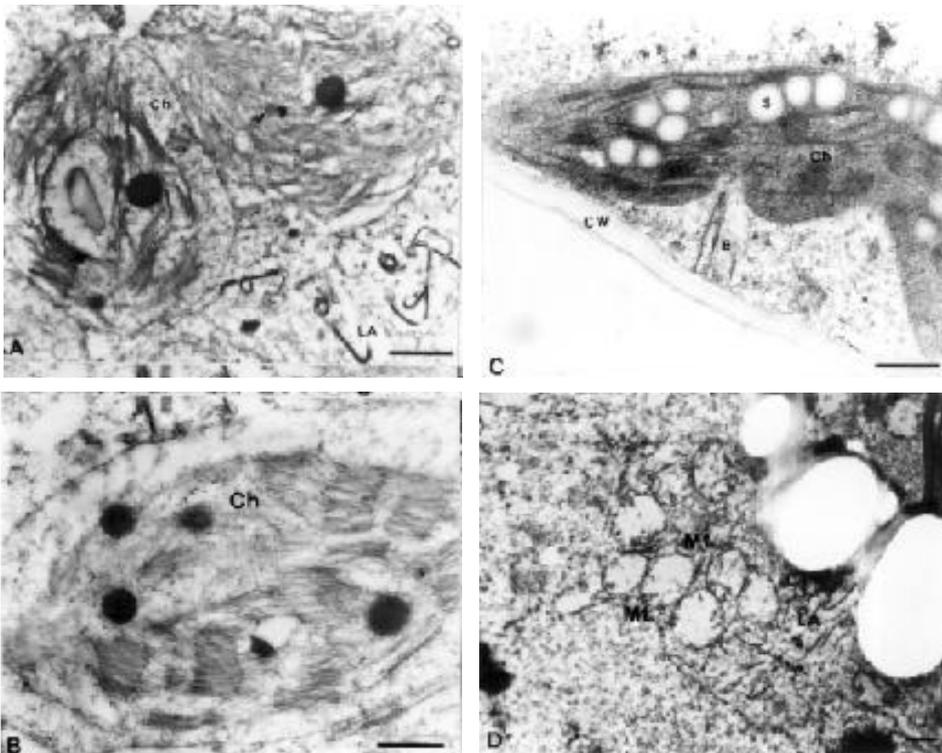
鞘蛋白分子量之比較

GCV-Am及TuMV-C1至C5五種系統之病毒鞘蛋白以SDS解離，再經13% polyacrylamide膠體電泳分析，並與標記蛋白比對結果，其相對分子量均為35 kDa。在病毒鞘蛋白下方 (約31 kDa) 另有一分子量較小的蛋白，可能是病毒在鞘蛋白純化或保存過程中分解所產生者 (圖5)。

茼蒿分離株與其他蕪菁嵌紋病毒株系間之血清關係

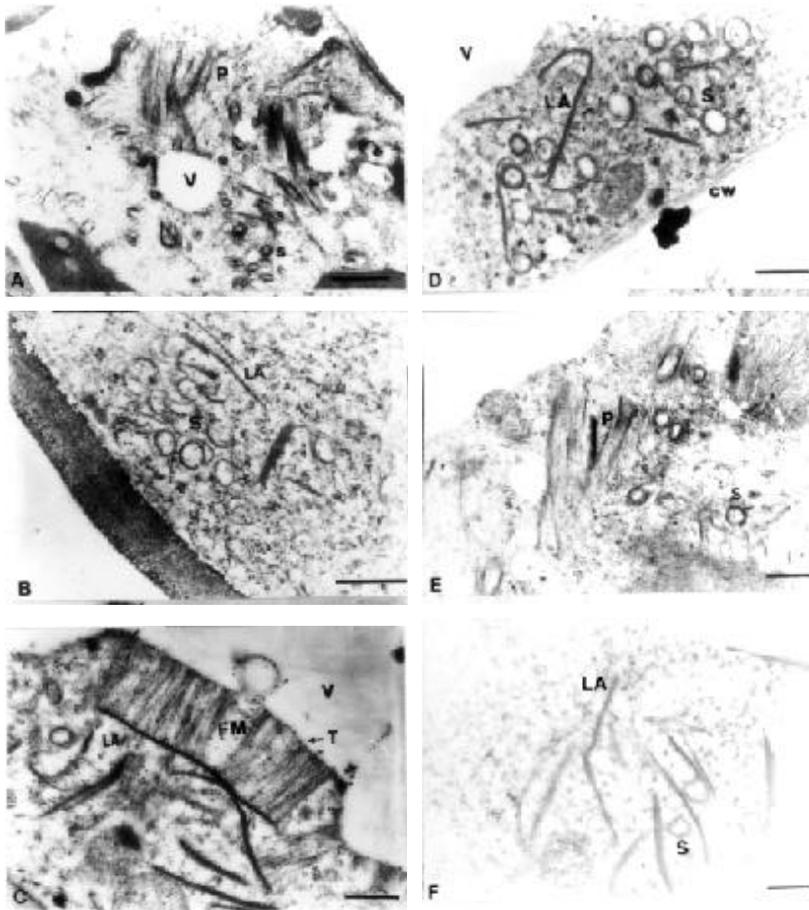
分別以TuMV-R抗血清及其抗原，與德國TuMV-B抗血清，和GCV-Am抗血清與感染GCV-Am之芥菜罹病組織粗汁液，以雙向免疫擴散法進行交叉反應結果顯示，TuMV-R抗血清，TuMV-B抗血清和GCV-Am抗血清三者與TuMV-R及GCV-Am均有反應產生相同的沉澱帶，且無叉狀反應 (spur reaction) 的出現 (圖6, A)。證實GCV-Am與蕪菁嵌紋病毒 (TuMV) 具有血清類緣關係。

為了解GCV-Am與TuMV各系統之間的血清類緣關係，因此以C1、C2、C3、C4與C5等5個TuMV系統之病毒為抗原與GCV-Am抗血清進行雙向免疫擴散反應，結果顯示GCV-Am抗血清除與同源的抗原有反應外，亦與TuMV5個系統均有親和性的沈澱反應 (圖6, B)。由此可知GCV-



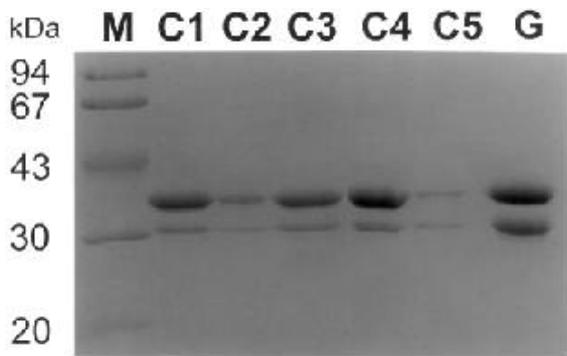
圖三、茼蒿白化嵌紋病毒感染芥菜細胞組織之變化。A與B：葉綠體被破壞，葉綠餅及板層變形退化。C：葉綠體內澱粉粒增加，靠近細胞膜處有束狀内含體形成。D：粒線體外膜完整，但脊已瓦解消失。

Fig. 3. Cytological alterations induced by GCV-Am in mustard. Bar = 500 nm. A and B, the chloroplasts (Ch) in the infected cells were disrupted and their grana and lamella were degenerated. C, starch grains (S) increased in number and a bundle inclusion (B) was associated with the plasma membrane at the early stage of infection. D, the outer membranes of mitochondria (Mt) were intact, but the cristae were degenerated.



圖四、茼蒿白化嵌紋病毒與蕪菁嵌紋病毒 C1、C2、C3、C4 及 C5 系統感染奎藜細胞組織學之變化。A：C1 系統誘導組織產生風車狀內含體之縱切面。V 為液胞。B：C2 系統感染奎藜組織產生捲軸狀與薄層狀內含體。C：C3 系統罹病組織產生絲狀群集體及薄層狀與捲軸狀內含體。D：C4 罹病組織產生薄層狀與捲軸狀內含體。E：C5 系統罹病組織產生風車狀內含體之縱切面與捲軸狀內含體之橫切面。F：GCV-Am 之奎藜組織切片中可見薄層狀及卷軸狀內含體。

Fig. 4. Cytological alterations induced by GCV-Am, C1, C2, C3, C4 and C5 of TuMV from Taiwan in *Chenopodium quinoa*. Bar = 400nm. A, a longitudinal section of pinwheel inclusions (P) in the cytoplasm induced by TuMV C1 strain. B, scrolls (S) and laminated aggregates (LA) were found in a cell infected with TuMV C2 strain. C, fibrous masses, laminated aggregates (LA) and scrolls (S) within the cytoplasm infected with TuMV C3. The fibrous mass (FM) oriented perpendicular to the tonoplast (T) and laid parallel to or perpendicular with laminated aggregates (LA). D, numerous inclusions of laminated aggregates (LA) and scrolls (S) produced by TuMV C4 strain. E, a longitudinal section of pinwheels inclusions (P) and cross section of scrolls (S) in the cytoplasm induced by TuMV C5 strain. F, laminated and scroll inclusion induced by GCV-Am.



圖五、茼蒿白化嵌紋病毒與蕪菁嵌紋病毒五個系統 (C1-C5) 鞘蛋白分子量之比較。M 為標準蛋白，C1 至 C5 分別為五個蕪菁嵌紋病毒系統，G 為純化之茼蒿白化嵌紋病毒。
Fig. 5. Comparison of coat proteins of GCV-Am and TuMV strains, analyzed by 13% SDS-PAGE after isopycnic centrifugation. Lane M, protein markers. Lanes C1-C5, the purified coat proteins of TuMV C1, C2, C3, C4 and C5 strains from Taiwan, respectively. Lane G, the purified coat protein of GCV-Am.

Am 與 TuMV 各系統間具有不可區分的血清類緣關係。

西方轉漬反應

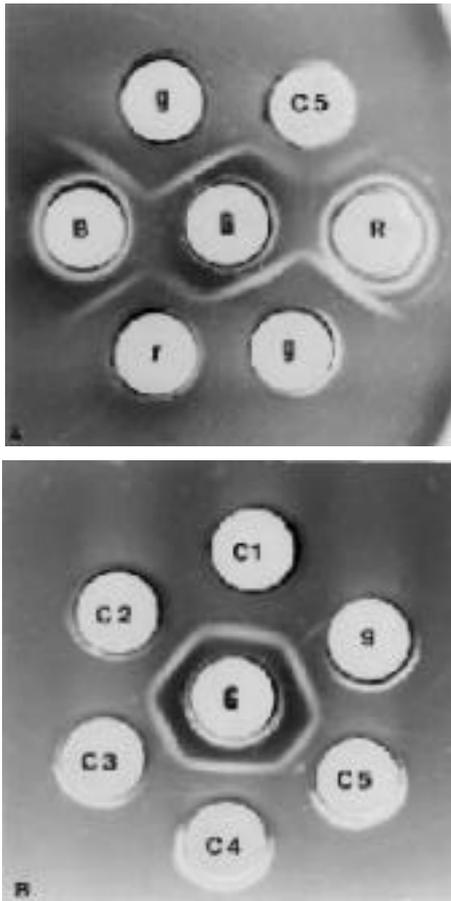
GCV-Am 與 TuMV-C1 至 C5 五個系統之病毒懸浮液經 SDS-PAGE 後，轉漬於硝化纖維膜 (NC paper) 上，再分別與 GCV-Am 抗血清及德國之 TuMV-B 抗血清作用。反應中，無論 GCV-Am 之病毒鞘蛋白或 TuMV-C1 至 C5 五個系統之病毒鞘蛋白均與 GCV-Am 抗血清及 TuMV-B 抗血清起作用，在 35 及 31 kDa 處產生紫色之反應帶 (圖 7)。

間接式酵素連結免疫分析

GCV-Am 抗血清及德國之 TuMV-B 抗血清分別與 GCV-Am 及 TuMV-C1 至 C5 五個系統之抗原，進行間接式酵素連結免疫反應之結果，經以波長 405 nm 測讀，顯示二種抗血清均可與 5 個 TuMV 系統及 GCV-Am 反應，而不與健康植物粗汁液反應 (圖 8)，且各系統間沒有明顯之差異。

討 論

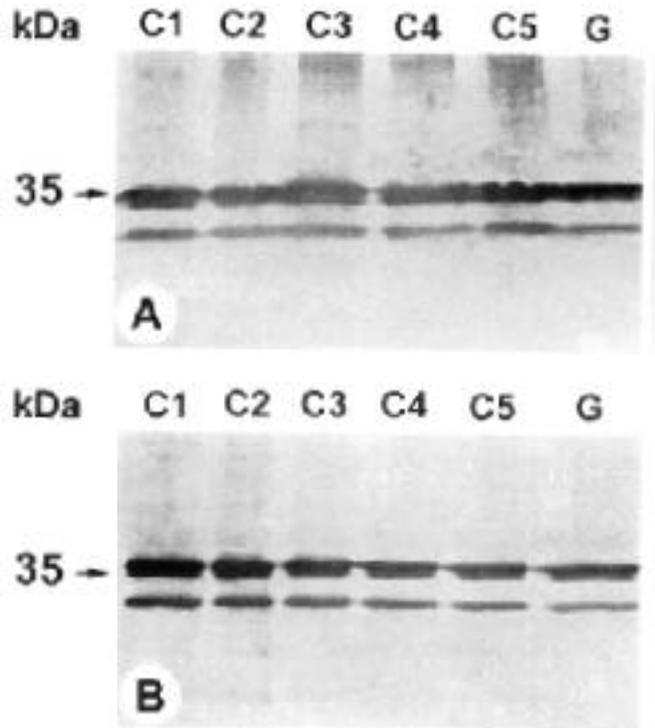
由於 TuMV 分佈廣泛，寄主範圍大，分類系統亦繁雜，早期 Yoshii 將 TuMV 區分為兩個系統，其中可以感染甘藍 (*B. oleracea subsp. capitata*) 造成嚴重壞疽且有輪斑病徵，並可感染菸草 (*N. glutinosa*) 形成嚴重嵌紋病徵者為



圖六、 苜蒿白化嵌紋病毒與蕪菁嵌紋病毒免疫雙向擴散反應中之血清類緣關係比較。 A：德國 TuMV-B (cabbage blackring strain) 抗血清 (B)、苜蒿白化嵌紋病毒 GCV-Am 抗血清 (G) 與台灣蘿蔔分離株 TuMV-R 抗血清 (R) 與 GCV-Am (g), TuMV-R (r) 及 TuMV-C5 (C5) 系統之血清關係，所用抗原為罹病芥菜組織之粗汁液。 B：GCV-Am 抗血清 (G) 與蕪菁嵌紋病毒 TuMV C1、C2、C3、C4 及 C5 系統所感染之芥菜病組織粗汁液之血清反應。

Fig. 6. Serological relationships determined by immunodiffusion tests using antisera to GCV-Am, TuMV-R a Taiwan radish isolate, and TuMV-B a Germany cabbage blackring strain. A, immunodiffusion test of GCV-Am (g), TuMV-R (r) and TuMV C5 (C5) strains against antisera to GCV-Am (G), TuMV-R (R), and TuMV-B (B). B, serological relationships as determined by immunodiffusion tests using crude antigens of GCV-Am (g) and the five TuMV strains C1, C2, C3, C4 and C5 extracted from virus-infected mustard against the antiserum to GCV-Am (G).

甘藍系統 (cabbage strain group)，而另一個普通系統 (common strain group) 亦可感染此兩種植物，但只引起輕微病徵。此二系統在地理分佈上有明顯不同，甘藍系統僅見於歐洲、美洲與澳洲，而普通系統廣泛分佈於世界各地⁽²⁹⁾。本研究中由苜蒿所分離之 GCV-Am 即屬於普通系統，與 Yoshii 所稱甘藍系統不曾在亞洲發現之結果相符。另外

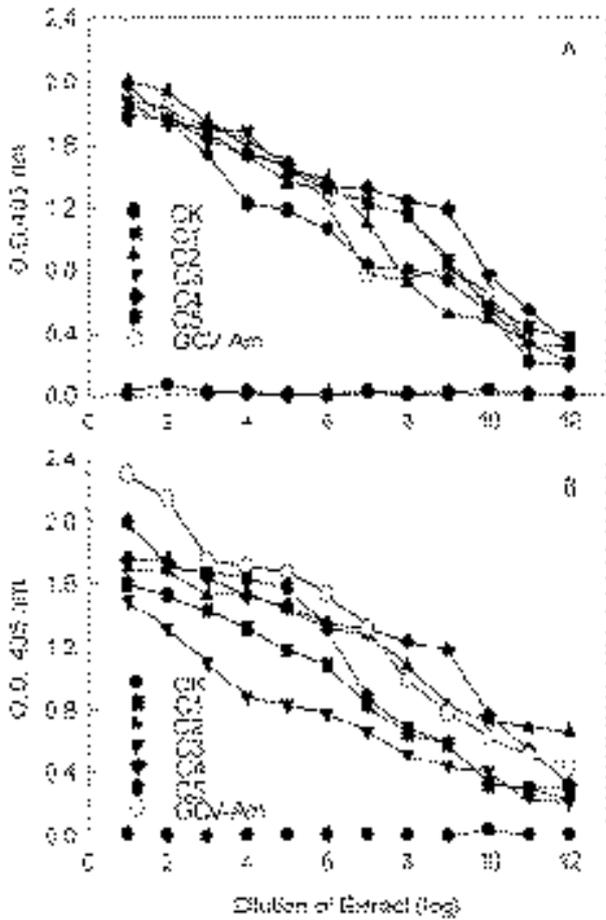


圖七、西方轉漬法比較苜蒿白化嵌紋病毒與蕪菁嵌紋病毒之類緣關係，C1至C5代表TuMV病毒系統，分別與德國 TuMV-B 抗血清 (A) 及苜蒿白化嵌紋病毒 GCV-Am (B) 抗血清。

Fig. 7. Serological relationships detected by Western blotting assay using the antisera to TuMV-B (A) and GCV-Am (B) to react with coat proteins of homologous and heterologous strains. Lanes C1-C5, the purified coat proteins of TuMV C1, C2, C3, C4, and C5 strains from Taiwan, respectively, Lane G, the purified coat protein of GCV-Am.

依 TuMV 在各種 *B. campestris subsp. pekinensis* 鑑別品種中所表現之病徵亦可區分為 5 個系統^(12,24)，本研究顯示 GCV-Am 可感染 TuMV 鑑別用四種 *B. campestris subsp. pekinensis* 品種，其結果與 TuMV-C5 系統相同。由於病毒感染植物後病徵之表現易因栽培環境、氣候之改變而有不同，且指示植物若為特殊品種則不易獲得，因此嘗試進一步利用細胞學及血清學之方法比較各系統間之異同。

一般而言，植物受病毒感染可在組織內產生特有的內含體，此種內含體可為聚集之病毒顆粒，病毒的基因產物或是改變的寄主細胞成份^(5,7)。這些內含體亦可做為判別病毒種類之依據，尤其是馬鈴薯 Y 屬病毒在罹病植物細胞質內均會誘導產生圓柱狀內含體。由於圓柱狀內含體的形態不易因環境或寄主植物的不同而有所改變，因此病毒所產生圓柱狀內含體之形態亦可為 *Potyviridae* 科的分類依據，如甘蔗嵌紋病毒 (sugarcane mosaic virus) 依內含體產生的形態與種類可被區分為四種亞群 (subgroup)^(21,28)。Edwardson⁽⁴⁾ 亦指出圓柱狀內含體可做為區分系統的指



圖八、間接ELISA比較茼蒿白化嵌紋病毒與蕪菁嵌紋病毒C1至C5系統之類緣關係測試時，分別使用德國 TuMV-B 抗血清 (A) 及茼蒿白化嵌紋病毒GCV-Am抗血清 (B)。
Fig. 8. Serological relationships detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay using the antisera to TuMV-B (A) and GCV-Am (B) to react with crude extracts from leaf tissues of mustard individually infected with GCV-Am, TuMV C1, C2, C3, C4 and C5 strains. Crude antigens were extracted from infected tissues and diluted by a tenfold series in coating buffer. Goat anti-rabbit IgG linked with alkaline phosphatase was used at 1:1000 dilution, readings at OD 405 nm were taken 30 min after the addition of substrate.

標，如TuMV之一般系統 (ordinary strain) 並無風車狀內含體存在，但佛羅里達系統 (Florida strain) 則可見風車狀內含體出現⁽⁸⁾。目前馬鈴薯Y屬病毒依內含體形態，可區分為4個subdivisions，TuMV依系統而異，分屬於subdivision III與subdivision IV⁽⁶⁾。在本實驗中，觀察 GCV-Am與TuMV五個系統之系統性寄主之內含體形態，均可見細胞質內產生薄層狀，卷軸狀，束狀之圓柱狀內含體，主要屬於subdivision III，而典型之風車狀內含體則不易發現，切片中除可見圓柱狀內含體外，另有不定形內含體產生，但並無核內含體的形成，此種現象與Edwardson and Purcifull

⁽⁸⁾ 及Hiebert and McDonald⁽¹⁴⁾ 觀察相似。

GCV-Am與TuMV之5個系統 (C1至C5) 其內含體形態基本上大同小異，值得一提的是束狀內含體 (bundle inclusion) 的形成，Lawson *et al.*⁽¹⁹⁾ 指出，束狀內含體初期形成位置是在細胞膜，其形成方向與細胞膜相接呈垂直，之後再轉移至細胞質內形成風車狀內含體。GCV-Am之切片亦可見束狀內含體，另外，在TuMV-C3的切片中也有類似病毒集團的絲狀群集體，其長度與 TuMV粒子相似。早期 Hayashi *et al.*⁽¹³⁾ 切片觀察 TuMV之一般系統 (ordinary strain) 發現絲狀群集體 (fibrous mass, FM)，不透明條帶 (dense band, DB) 與環形 (ring, R) 等三種構造，並認為此三種構造均由TuMV粒子所組成，但目前已知DB屬於薄層狀內含體，R屬於卷軸狀內含體，至於FM並無相關報告提及，是否由病毒顆粒組成，或是特殊系統產生之構造，仍需進一步證實。在本實驗TuMV-C3的切片中，可以很清楚的看到絲狀群集體 (FM) 平行排列與液胞膜相連。但即使同是一般系統，來自不同地區的分離株，其切片形態仍有不同，源自日本P分離株可明顯看到FM，而美國R分離株則不易發現⁽¹³⁾。因此GCV-Am與TuMV-C1至C5系統不易以細胞質內產生之內含體型態區分。

觀察被TuMV感染的細胞病變情形，發現粒線體的脊 (cristae) 消失；葉綠體顯著變小外，葉綠餅 (grana) 及板層 (lamella) 均顯著變形⁽¹⁾，本實驗亦可觀察到上述現象，此外尚有澱粉粒變小且數目增加的情形，在健康組織切片中則無上述現象產生。但亦有報導指出，TuMV感染奎藜所形成之單斑，除薄層狀內含體出現外，被感染細胞的葉綠體有明顯增多的情形，且在葉綠體表面有許多病毒顆粒聚集，其它長絲狀病毒感染的奎藜則無此現象。學者相信病毒顆粒與葉綠體之間可能存在專一性的受體位置 (receptor sites)⁽¹⁵⁾，而此種現象可做為TuMV感染的鑑定依據。但是在GCV-Am及TuMV各系統的切片觀察中，C5系統之葉綠體雖有聚集情形，數目卻未如Kitajima所述20個以上，且在葉綠體表面亦無病毒顆粒聚集的現象，此種差異或與病毒分離株之感病性有關，尚待更深入之探討。

在血清學方面探討中，GCV-Am、台灣TuMV-R及德國TuMV-B之抗血清與GCV-Am、TuMV-R及TuMV-C5抗原於免疫雙向擴散反應均呈融合性沈澱帶，顯示其血清關係不可區分。另外，GCV-Am抗血清與GCV-Am及TuMV-C1至C5五個系統之病毒進行免疫雙向擴散反應，結果五個系統均可與GCV-Am抗血清形成相連的沉澱帶，並無叉狀反應或交叉沉澱帶形成，為不可區分的親和性融合反應。復以GCV-Am與德國TuMV-B抗血清分別與GCV-Am及TuMV-C1至C5五個系統之罹病粗汁液進行間接酵素連結免疫抗體吸附法，讀值均在1.5以上，與健康植物粗汁液之反應相較差異相當顯著，進一步比較 GCV-Am及TuMV-C1至C5五個系統之鞘蛋白分子量，此六種病毒均呈現二條主要條帶，分別為35 kDa及31 kDa；而利用西方

轉漬法，分別以德國 TuMV-B 抗血清、GCV-Am 抗血清與 GCV-Am 及 TuMV-C1 至 C5 五個系統之鞘蛋白反應，反應帶亦在 35 kDa 與 31 kDa 處出現，此結果與前人報告 TuMV 之鞘蛋白極易在純化或保存過程中裂解成 2 或 3 個 components 之結果相符⁽¹⁴⁾，顯示 GCV-Am 及 TuMV-C1 至 C5 系統之鞘蛋白分子量相同，而 31kDa 的條帶為鞘蛋白裂解所產生。本實驗結果顯示：由於 GCV-Am 與 TuMV-C1 至 C5 各系統鞘蛋白之血清親緣關係相近利用血清學方法及鞘蛋白分子量無法將之區分開來。

綜合上述之結果，GCV-Am 確係屬於 TuMV 之一分離株，由細胞學、血清學等特性不易區分其系統歸屬，而由寄主植物病徵之表現顯示 GCV-Am 屬於 TuMV 之 C5 系統。而有關 TuMV 五個系統與 GCV-Am 核酸層次鞘蛋白基因之差異性，則待進一步分析比對。未來，擬藉由對鞘蛋白基因的了解，進行轉基因植物的構築，並在病害管理上提供一良好的策略。

謝 辭

本研究蒙國科會補助經費 (NSC86-2313-B-005-056)，農試所張清安博士提供蕪菁嵌紋病毒抗原與抗血清及亞洲蔬菜中心 Dr. S. K. Green 提供五種蕪菁嵌紋病毒系統、白菜鑑別品種與德國 TuMV 白菜分離株抗血清，謹誌謝忱。

引用文獻

1. 陳脈紀. 1975. 十字花科蔬菜嵌紋病毒之電子顯微鏡研究. 植保會刊 17:319-28.
2. 陳滄海、吳秀芳. 1994. 台灣地區十字花科作物病毒之發生與病因學之探討. 植病會刊 3:243-244.
3. 陳煜焜、陳翠妙、陳脈紀. 1996. 茼蒿白化嵌紋病之病因診斷. 植病會刊 5:55-62.
4. Edwardson, J. R. 1992. Inclusion bodies. Arch. virol. (Suppl.) 5:25-30.
5. Edwardson, J. R., and Christie, R. G. 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 16:31-55.
6. Edwardson, J. R., and Christie, R. G. 1991. The potyvirus group. Volumes IV, Fla. Agric. Exp. Stn. Monog. 16.
7. Edwardson, J. R., and Ko, N. J. 1984. Potyvirus cylindrical inclusions-subdivision-IV. Phytopathology 74:1111-1114.
8. Edwardson, J.R., and Purcifull, D.E. 1970. Turnip mosaic virus-induced inclusions. Phytopathology. 60:85-88.
9. Franenkel C. H., Singer, B., and Tsugita, A. 1961. Purification of RNA by means of bentonite. Virology 14:54-58.
10. Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein blotting. In : Methods in Molecular Biology Vol. 1. Protein. pp. 165-178.
11. Green, S. K., and Deng, T. C. 1982. Investigations on the occurrence of TuMV strain on the cruciferous vegetables in Taiwan and the possible detection of a new strain of TuMV. Plant. Pro.Bull. 24:286-287. (Abstr.)
12. Green, S. K., and Deng, T. C. 1985. Turnip mosaic virus strains in cruciferous hosts in Taiwan. Plant Dis. 69:28-31.
13. Hayashi, T., Matsui, C., and Yamaguchi, A. 1965. Electron microscopy of intracellular turnip mosaic virus. Phytopathology 55:458-461.
14. Hiebert, E., and McDonald, J. G. 1973. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. Virology 56: 349-361.
15. Kitajima, E. W., and Costa, A. S. 1973. Aggregates of chloroplasts in local lesions induced in *Chenopodium quinoa* Wild. by turnip mosaic virus. J. Gen. Virol. 20 :413-416.
16. Ko, N. J., 1987. LR White embedding for immunogold labeling of virus-infected plant tissues. Proc. Natl. Council. Sci. Series B., R. O. C. 11:206-210.
17. Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55:53-62.
18. Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
19. Lawson, R. H., Hearn, S. S., and Smith, F. F. 1971. Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. Virology 46: 453-463.
20. Lin, C. C., and Lain, L. S. 1983. Comparative cruciferous host symptoms of turnip mosaic isolate in Taiwan. J. Agric. Res. R. O. C. 32:367-372.
21. Lesemann, D E., Shukla, D. D., Tosic, M., and Huth, W. 1992. Differentiation of the four viruses of the sugarcane mosaic virus subgroup based on cytopathology. Arch. virol. (Suppl.) 5:353-361.
22. Provvidenti, R., Robinson, R. W., and Shail, J. W. 1979. Chicory: A valuable source of resistance to turnip mosaic virus for endive and escarole. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 104:726-728.
23. Provvidenti, R. 1980. Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 105:571-573.

24. Provvidenti, R. 1982. A destructive disease of garden balsam caused by a strain of turnip mosaic virus. *Plant Dis.* 66:1076-1077.
25. Provvidenti, R., Robinson, R. W., and Shail, J. W. 1979. Chicory: A valuable source of resistance to turnip mosaic virus for endive and escarole. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104:726-728.
26. Purcifull, D. E., and Batchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) -treated plant viruses and plant viral inclusions. *Fla. Agric. Exp. Stn. Bull.* 788.
27. Shukla, D. D., and Schmelzer, K. 1972. Studies on viruses and virus diseases of cruciferous plants. *Acta Pytopathol. Acad. Sci. Hung.* 8:127-137.
28. Shukla, D. D., Frenkel, M. J., McKern, N. M., Ward, C. W., Jilka, J., Tosic, M., and Ford, R. E. 1992. Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. *Arch. Virol. (Suppl.)* 5: 363-373.
29. Yoshii, H. 1963. On the strain distribution of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 28:221-227.

ABSTRACT

Chen T. M.¹, Chen Y. K.¹, Chen M. J.¹, and Yeh S. D.^{1,2} 1999. Host reactions, cytological characteristics and serological properties of a turnip mosaic virus isolate causing albinic mosaic disease of garland chrysanthemum. *Plant Pathol. Bull.* 8:73-82. (¹ Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University ; ² Corresponding author, E-mail: sdye@nchu.edu.tw , Fax No: 04-2852501)

A disease of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* var. *spatiosum* Bailey) showing symptoms of albinism, mosaic, cleavage of leaves and stunted growth was found in the central part of Taiwan. A filamentous potyvirus (named GCV-Am) about 775 × 13nm in size was isolated from the infected plants and proved to be the causal agent of the disease. In this investigation, it was further compared with the C1, C2, C3, C4, and C5 strains of turnip mosaic virus (TuMV) by host reactions, cytological characteristics and serological properties. GCV-Am induced symptoms on *Brassica campestris* subsp. *pekinensis* cultivars Tropical delight, Crusader, PI 418957 and PI 419105, similar to those induced by the TuMV C5 strain originated from Taiwan. All isolates of the TuMV strains used in current studies induced cylindrical inclusions in host cytoplasm, in the shapes of pinwheels, laminated aggregates, scrolls and bundles. In immunodiffusion tests, coalescent precipitin lines without spurs were observed when antisera to GCV-Am, a Taiwan radish TuMV-R isolate, and a cabbage TuMV-B isolate from Germany were used to react with crude antigens from mustard infected with GCV-Am, TuMV-R, or the C5 strain. Also, similar results were noticed when the antiserum to GCV-Am was used to react with crude antigens of homologous GCV-Am and heterologous C1, C2, C3, C4 and C5 strains. In indirect ELISA and western blotting tests, the antisera to GCV-Am or TuMV-B also reacted with the GCV-Am isolate and the other five strains, indistinguishably. The molecular size of the coat protein of GCV-Am was found to be 35kDa similar to those of other five strains. The results of this study indicated that GCV-Am belongs to the C5 strain of TuMV based on host reactions, but indistinguishable from other TuMV strains from Taiwan in cytopathological characteristics and serological properties.

Keywords : garland chrysanthemum albinic mosaic virus, turnip mosaic virus, serology, cytopathology