

利用煙草白肋種 (White Burley) 分離甜椒病毒

黃玉堂 劉秀鈴 盧耀村

臺中市 國立中興大學植物病理學研究所

接受日期：中華民國 83 年 5 月 24 日

摘 要

黃玉堂、劉秀鈴、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。

本省甜椒的栽培，常遭受病毒的複合感染，造成生長後期皆出現嚴重的斑駁嵌紋病徵，而難以直接從後期罹病株分離鑑定為害的病毒種類。從初發病出現較多的脈綠嵌紋病葉，以 10 倍量 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 研磨，粗汁液機械接種至一系列判別植物，從接種的煙草 White Burley (W. B.) 所出現的病徵，加以單離後鑑定為害病毒種類。首先從 W. B. 接種葉所出現的黃斑，經過單一病斑的分離，得到二個不同分離株；即只在接種葉出現黃斑 (YS)，及除接種葉外上位葉也會出現斑點 (SYS) 之兩個性質不同分離株。經過寄主範圍、血清反應及粒子形態觀察，獲知兩者是病原性有所不同的 Chili veinal mottle virus，另外從煙草 W. B. 心葉所出現的嵌紋病徵，經過 Sepharose CL-6B 色層分析與病原性測定，在第一吸收峰 (R1) 及其肩狀凸起處 (R2) 所分離之病毒分離株，均能使甜椒出現退綠黃化的斑駁病徵。雖然兩分離株病毒，對胡瓜嵌紋病毒抗血清皆無 spur 的反應帶出現，但是經過單離後之 R1 病毒分離株為 30 nm 見不到中心 (core) 的球狀病毒；而 R2 為 28 nm，能見到 core 的球形病毒，即在粒子形態上有所不同。又在寄主範圍上，兩種分離株在煙草 W. B.、*N. glutinosa* 與萬桃花上呈現病徵也有所不同，由此推知兩者皆屬 Cucumovirus 群中的病毒，即 R1 為胡瓜嵌紋病毒，而 R2 則屬花生矮化病毒中之一系統。

關鍵詞：煙草 White Burley，病毒分離、甜椒病毒、胡瓜嵌紋病毒群。

緒 言

本省甜椒的栽培，普遍遭受病毒的為害，發病初期從心葉所出現的病徵以脈綠斑駁嵌紋 (vein banding mottle mosaic) 為最多，其次為黃化退綠斑駁嵌紋 (chlorotic mottle mosaic)，有時候也可以發現少數壞疽病徵 (necrotic symptom) 植株出現。然而隨著甜椒的生長，後期葉片皆呈葉幅略狹的花葉斑駁嵌紋 (veinal mottle mosaic) 病徵。

有關本省番椒，包括甜椒與辣椒病毒在本省的研究，已鑑定的病毒有煙草嵌紋病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) (2,4) 胡瓜嵌紋病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) (1,15)，馬鈴薯病毒 X (Potato virus X, PVX) (4)，馬鈴薯病毒 Y (Potato virus Y, PVY) (7) 及最近分離得到的番茄斑點萎凋病毒 (Tomato spotted wilt virus, TSWV) (3)。亞洲蔬菜中心報告指出，為害

世界各地番椒的病毒種類計有 40 多種，分散在 17 病毒群中 (8,15)。在鄰近的日本，從呈現嵌紋病徵的甜椒不同病株中，可分離到的病毒種類有 TMV，CMV，Broad bean wilt virus (BBWV) 及 Chrysanthemum mild mottle virus (CMMV) 等 (5,6)，而歐美則有 Tobacco etch virus (TEV)，CMV，TMV，PVX，Tobacco rattle virus (TRV)，Tomato spot wilt virus (TSWV)，Pepper mottle virus (PMV) 及 Chili veinal mottle virus (CVMV) 等 (9,10,11,13,14,17,18,20)。

為要有系統地建立為害本省甜椒主要病毒種類及其單獨感染時所呈現的病徵等基本資料，俾供未來育種專家進行抗病育種選用，以解決或減輕農民栽培甜椒時所受的危害，以及製備抗血清供今後快速檢疫之需，首先選用發病較多且普遍的脈綠斑駁病株為材料，進行分離與鑑定甜椒病毒。

材料與方法

罹病材料之選擇與接種

從本省中部竹山地區採集發生比較普遍的甜椒脈綠嵌紋初期病徵為材料，分別加入10倍量的0.1 M磷酸緩衝液 pH 7.2，研磨低速離心後上澄液，以摩擦法汁液接種到表一所示的一系列判別植物上，接種葉清洗後置於網室，觀察寄主之病徵反應，由判別植物之反應，進行病毒種類的分離。

病毒之分離與種類之鑑定

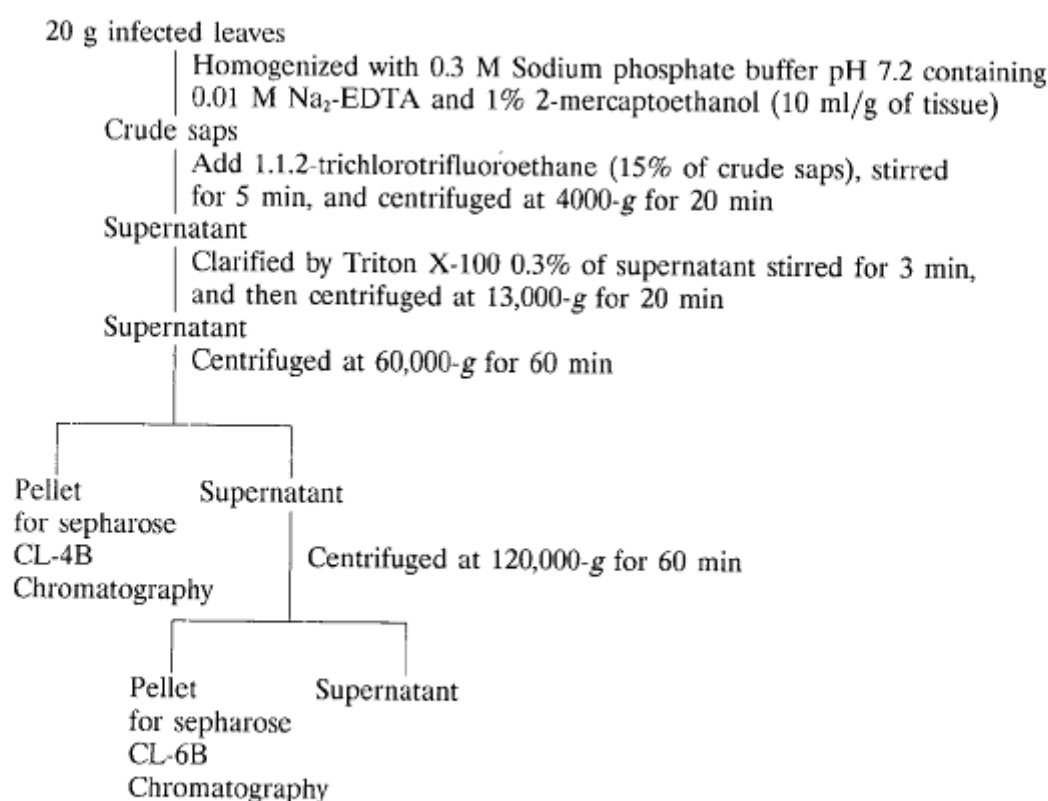
由寄主之接種反應，首先選用普遍會在煙草 White Burley 21 (W. B.) 上感染而出現病徵者為材料，分離為害本省甜椒之病毒種類，即從 W. B. 接種葉及心葉所出現的病徵，分別加以病毒的單斑分離後，再繼代汁液接種至煙草 W. B. 上，以單離病毒，最後回接至原寄主甜椒苗上，以確定其病原性及其所出現的病徵，所用的甜椒品種，以在本省中部栽培較普遍的藍星為主。單離後所得的病毒，分別接種在表二所示判別植物上，從其寄主範圍、物理性質、直接陰染電子顯微鏡觀察與病毒粒子形態及已知血清反應，以鑑定所分離的本省甜椒病毒種類。

病毒之純化

單離後的病毒，分別接種在煙草 W. B. 上繁殖，供病毒純化材料。採初發病罹病葉 20 g，加入10倍量 0.3 M 磷酸緩衝液 pH 7.2，內含 0.01 M 乙二氨四醋酸鈉 ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) 及 1% 2-羥基乙硫醇 (2-mercaptoethanol) 研磨，紗布過濾後汁液，加入汁液量 15% 之有機溶媒三氯三氟乙烷 (1,1,2-trichlorotrifluoroethane) 攪拌 5 分鐘，低速 4,000-g 離心 20 分鐘，以去除變性植物成份後，上澄液再加入其總汁液量 0.3% 之 Triton X-100 處理 3 分鐘，再經高速 13,000-g 離心 20 分鐘取其上澄液，用一系列超高速 60,000-g 及 120,000-g 連續離心各 60 分鐘，將病毒沉降，沉澱物分別以 0.1 M 同種緩衝液懸浮濃縮成 1.5 ml 後，在微量離心管 1000 rpm 離心 5 分鐘後，取其上澄液供 Sepharose CL-4B 及 CL-6B 凝膠色層分析進一步純化，其過程如圖一：

分子篩孔凝膠色層分析純化

將 60,000-g 離心沉降試料選用 CL-4B 而 120,000-g 試料則選用 CL-6B 分別將 Sepharose 凝膠，原緩衝液經稀釋 10 倍後之溶液洗滌，在減壓至 30 torr 維持 10 分鐘後，裝成 0.9×55 cm 高的管柱，再將上述濃縮後試料加入，待試料沉澱至凝膠內，用同種緩衝液流出，



圖一、甜椒病毒之分離純化過程示意圖。

Fig. 1. The procedure for isolation and purification of the sweet pepper viruses.

表一、甜椒脈綠斑駁嵌紋罹病葉，汁液接種在判別植物上之病徵反應

TABLE 1. Symptoms produced on indicator plants by crude sap inoculation with inocula prepared from leaves of sweet pepper plants showing vein banding mottle mosaic

Samples inoculum	甜椒 (藍星) <i>Capsicum annuum</i> var. bluestar	紅藜 <i>Chenopodium</i> <i>amaranticolar</i>	綠藜 <i>C. mulare</i>	萬桃花 <i>Datura metel</i>	千日紅 <i>Gomphrena globosa</i>	煙草 (W.B.21) <i>Nicotiana tabacum</i> var. White Burley 21	矮牽牛 <i>Pectunia hybrida</i>	酸漿 <i>Physalis floridana</i>
No. 1	VC-VBM	—	—	—	—	YS-GIM	—	—
2	VC-VBM	—	—	—	—	YS-GIM	—	—
3	VC-VV	—	—	VC	—	M	m	M
4	VC-M	—	—	VC	—	M	m	M
5	VC-VBM	—	—	—	—	YS-GIM	—	—

VC=vein clearing. VBM=vein banding mosaic. VV=vein veinal mottle. M=mosaic. YS=yellow spot. m=mild mosaic. GIM=green islands mosaic (evoke mosaic).

並利用波長 254 nm 紫外光鑑視，靠自動收集儀每管收集 1 ml，直至透光率迴歸原點為止。依記錄器描繪圖形收集在波長 254 nm 處，具有吸收值之流出液作成電子顯微鏡試料觀察，同時汁液接種到甜椒苗上，再從病原性確定病原存在位置。

結 果

判別植物之汁液接種反應

採收田間初期發病呈脈綠斑駁嵌紋 (圖二) 病葉 5 個不同株，分別如方法所述汁液接種至表一所示植物，由寄主之接種反應，以分離侵入感染之病毒種類，其反應結果如表一：

由表一接種植物汁液接種反應結果顯示，接種源病徵相同，即同樣顯示脈綠斑駁嵌紋病徵之罹病株，侵入感染的病毒，也不盡相同。五個呈現脈綠斑駁嵌紋的不同株接種源中，對於煙草 White Burley 皆能感染，但所出現的病徵不完全相同。其中以接種葉出現大形黃點，隨著時間的進展心葉出現綠泡狀嵌紋病徵者，五株中有三株出現為最多。因此選用出現比較多的接種葉出現大形黃斑，後期心葉出現嵌紋者為材料，進行病毒種類的分離試驗。

病毒之單斑分離

從接種葉所出現的黃斑進行 3 次繼代單斑分離，個別接種至煙草 W. B. 及紅藜上，結果在 10 個單斑分離的汁液接種中紅藜皆未能感染，而接種在 W. B. 上接種葉皆能出現同樣大型黃斑 (Yellow spot, YS) 病徵 (圖三)，其中有 3 個單斑，隨著煙草 W. B. 生長，在未接種的上位葉也會出現斑點。再從上位葉所出現的斑點進行同樣單斑分離，最後獲得黃斑在接種葉以外，上位葉也會出現斑點的系統性黃斑 (Systemic yellow spot; SYS) 之另一分離株 (圖四)。將 YS 與 SYS 分離

株分別接種在煙草 W. B. 上保存，並回接至甜椒苗上，結果兩者在甜椒苗上經過 10 天，心葉皆出現脈綠斑駁嵌紋病徵。以直接陰染電子顯微鏡鏡檢，YS 與 SYS 分離株皆觀察到大小為 740–760 × 12 nm 長絲狀粒子存在。

另外取心葉出現泡狀嵌紋病葉為材料，同樣汁液接種至煙草 W. B.、紅藜及甜椒苗上，結果煙草在 15–20 天以後出現綠泡嵌紋，紅藜第 3–4 天，出現大小不同的局部病斑，而甜椒於第 7–10 天心葉出現退綠黃化斑駁病徵。由於紅藜上所出現的斑點大小有所不同，分別挑出大斑與小斑，經過同樣的三次連續性單斑分離，最後接種至煙草 W. B. 及甜椒，結果大斑病毒在煙草 W. B. 上出現綠泡嵌紋病徵；小斑病毒 20 天後只出現嵌紋而未有綠泡出現，而在甜椒上，兩者皆於第 10 天後出現難區分的退綠黃化嵌紋病徵。直接陰染法電子顯微鏡觀察，小斑病毒為大小 30 nm 為主的球形病毒將其命名為 R1 分離株；而大斑病毒為大小 28 nm 為主的球形病毒，將其命名為 R2 分離株。

病毒之分離濃縮與凝膠分子篩孔色層分析純化

將經過單斑分離後 YS、SYS 與 R1、R2 等不同病毒分離株，分別在煙草 W. B. 上繁殖，採收其初發病葉片 20 g，依圖一所述過程，將超高速離心機部份純化濃縮後，所得之 60,000-g 及 120,000-g 試料，分別利用 Sepharose 凝膠分子篩孔色層分析將病毒進一步純化，所得之各不同吸收峰，分別汁液接種至甜椒幼苗，由病原性測定病毒存在位置，同時分別供電子顯微鏡觀察病毒粒子形態，同時取單斑分離前的煙草 W. B. 罹病材料供為對照。汁液接種結果如表二所示。

經單斑分離後 YS 與 SYS 病毒分離株，在 60,000-g 試料中於 254 nm 波長下皆出現三個不同分子量吸收峰，分別以 2% 醋酸鈾陰染，在電子顯微鏡觀察下，發現二者皆在第一吸收值試料中，有大小 740–760 × 12 nm 長絲狀粒子存在 (圖五、圖六)，而第二與第三



圖二、田間所發生甜椒之初期病徵。

Fig. 2. Primary symptom of infected plants of sweet pepper in the field.



圖三、YS分離株在煙草 W.B.上病徵。→ = 接種葉

Fig. 3. The symptom of YS isolate on *Nicotiana tabacum* var. White Burley 21. → = inoculated leaves.



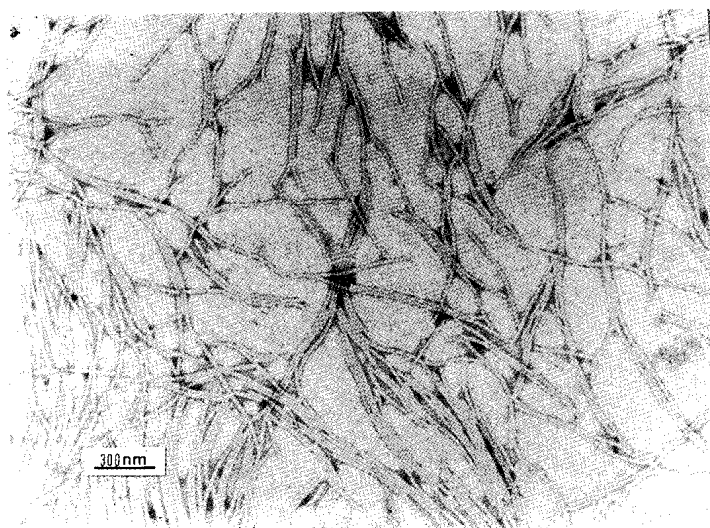
圖四、SYS分離株在煙草 W.B.上病徵。→ = 接種葉

Fig. 4. The symptom of SYS isolate on *Nicotiana tabacum* var. White Burley 21. → = inoculated leaves.

吸收值試料則未見絲狀粒子存在，再分別汁液接種至煙草 W. B. 與甜椒苗上，結果只有第一吸收值試料具有病原性，二者皆能使煙草接種葉出現大形黃化斑點，而甜椒心葉則出現脈緣斑駁嵌紋。又在 120,000-g 沉降試料中，二者雖然也同樣出現三個較低的不同吸收峰，電子顯微鏡觀察，第一吸收值處並未見完整絲狀粒子存在，而是不定形的塊狀粒子，第二吸收值處則為較均勻性的似核糖體粒子，而第三吸收值為不規則形的粒子存在，汁液接種的結果，在煙草 W. B. 及甜椒皆

無黃斑與退緣嵌紋病徵出現，由此知 YS 與 SYS 病毒在 60,000-g 即可完全沉降。

另外從煙草 W. B. 心葉所出現的嵌紋病葉為材料，經 Sepharose CL-6B 層析純化所得具有病原性的第一吸收峰及其肩狀凸起處，汁液接種經由紅藜單斑分離後所得的 R1、R2 分離株純化試料，在離心力 60,000-g 試料中，也有三個不同吸收峰出現，電子顯微鏡觀察，兩分離株在第一吸收峰處為無特異性的細絲狀物存在，第二第三吸收峰為不定形的粒子存在；而在 120,000-g



圖五、YS分離株 Sepharose CL-4B 色層分析純化後電子顯微鏡下粒子形態。

Fig. 5. Electron micrograph of YS isolate particles after Sepharose CL-4B chromatography purification.

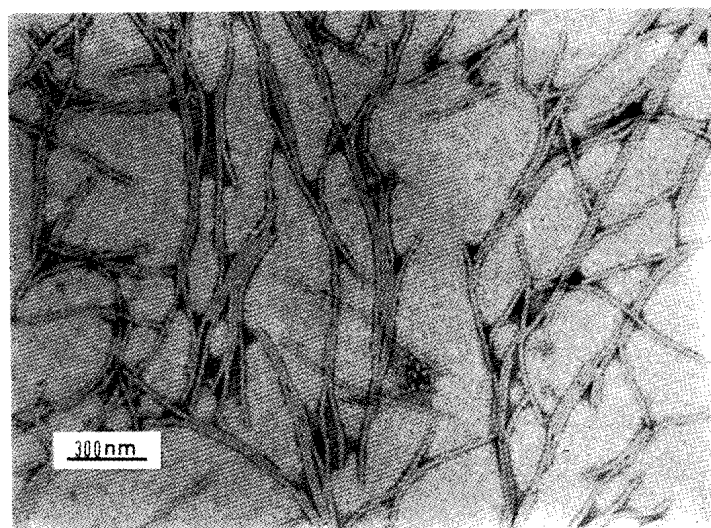
表二、甜椒不同分離株病毒 YS、SYS、R1、R2 在不同離心力沉降試料，經 Sepharose 分子篩孔色層分析純化，所得各不同吸收值試料之病原性測定

TABLE 2. Infectivity tests of fractions of YS, SYS, R1 and R2 virus isolates from sweet pepper after ultracentrifugation and sepharose molecular sieve chromatography

Virus Isolates	60,000-g			120,000-g		
	Peak I	II	III	Peak I	II	III
YS	+	-	-	-	-	-
SYS	+	-	-	-	-	-
R1	-	-	-	+	-	-
R2	-	-	-	+	-	-
CK	+	-	-	+	-	-

的層析試料中，R1分離株出現三個光滑的吸收峰，而R2分離株所出現三個的吸收峰，在第一吸收峰處出現肩狀凸起，分別取出各個吸收峰與肩狀凸起處試料，電子顯微鏡觀察，R1分離株之第一吸收峰處為未能見到粒子中心(core) 30 nm 大小的球形粒子(圖七)，而R2分離株的第一吸收峰及肩狀凸起處可明顯見到粒子中心的 28-30 nm 球形粒子(圖八)，而兩者的第二吸收峰試料皆為大小 12-15 nm 似核糖體的球形粒子，第三吸收峰試料為不規則形粒子存在，分別汁液接種結果，兩者皆在第一吸收峰及肩狀凸起處試料中具有病原性，能使甜椒苗出現退綠嵌紋病徵，而煙草 W. B.、R1分離株出現斑駁嵌紋，而R2分離株及肩狀凸起處試料出現綠泡嵌紋病徵。

另外取單斑分離前的罹病煙草 W. B. 病葉為對照組者，在兩個不同離心力試料中的色層分析純化，所



圖六、SYS分離株 Sepharose CL-4B 色層分析純化後電子顯微鏡下粒子形態。

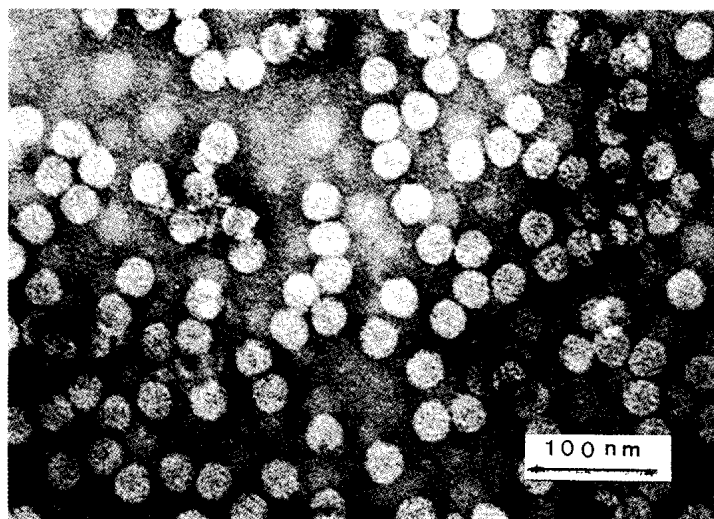
Fig. 6. Electron micrograph of SYS isolate particles after Sepharose CL-4B chromatography purification.

出現的三個不同吸收峰中 60,000-g 試料的吸收峰出現不平滑的吸收曲線，而 120,000-g 的試料也出現三個不同吸收峰，惟第一吸收峰明顯地分為相接雙峰。兩不同離心力分離試料分別經電子顯微鏡觀察，60,000-g 不平滑吸收試料，可觀察到同樣長絲狀粒子及少數球形粒子存在，而 120,000-g 分離試料的第一吸收處分為兩相接的雙峰狀，前者為 30 nm 為多的球形粒子，而後者則為可見到粒子中心(core)為多的粒子，而色層分析前的試料，則可觀察到 28-30 nm 左右可見到粒子中心(空心)與見不到粒子中心(實心)的兩種粒子存在(圖九)。汁液接種測定病原性，在煙草 W. B. 上 60,000-g 分離試料，接種葉出現黃斑心葉出現斑駁嵌紋，而 120,000-g 的分離試料，兩相接雙峰試料，皆出現不明顯綠泡狀斑駁嵌紋病徵；在甜椒苗上 60,000-g 試料出現脈綠斑駁病徵；而 120,000-g 試料兩者皆能出現退綠的嵌紋病徵。

病毒種類之鑑定

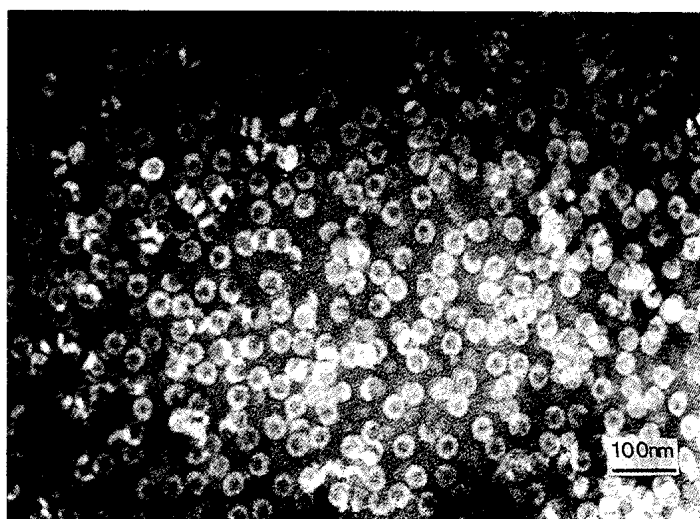
將色層分析純化後試料汁液接種，在甜椒上具有病原性的局部性黃斑(YS)與系統性黃斑(SYS)兩分離株試料，用原色層分析所用的緩衝液稀釋 5 倍後，以摩擦法汁液接種至表三所示判別植物，從寄主範圍的差異以區別此二分離株的病毒種類，結果如表三所示。

由表三結果顯示，YS 與 SYS 兩分離株病毒，除在煙草 W. B. 上 YS 分離株只在接種葉出現大形黃斑，而 SYS 分離株除在接種葉出現大形黃斑外，未接種的心葉隨著時間也會出現斑點。又同樣在煙草 *N. sylvestris* 與 *N. rustica* 上，接種葉 SYS 分離株，在接種葉所出現的壞疽斑會擴散外，其餘皆相同觀察不到任



圖七、R1分離株 Sepharose CL-6B 色層分析純化後電子顯微鏡下的粒子形態。

Fig. 7. Electron micrograph of R1 isolate particles after Sepharose CL-6B chromatography purification.



圖八、R2分離株 Sepharose CL-6B 色層分析純化後電子顯微鏡下的粒子形態。

Fig. 8. Electron micrograph of R2 isolate particles after Sepharose CL-6B chromatography purification.

表三、單斑分離後的 YS 與 SYS 分離株之寄主範圍反應
TABLE 3. Host reactions of YS and SYS isolates after single-leison isolation

Indicator plants	Isolates	
	YS	SYS
甜椒 <i>Capsicum annuum</i> (藍星)(Blue star)	VBM	VBM
紅藜 <i>Chenopodium</i> <i>amaranticolar</i>	—	—
胡瓜 <i>Cucumis sativus</i>	—	—
萬桃花 <i>Datura metel</i>	DVY	DVY
曼陀蘿 <i>D. stramonium</i>	—	—
千日紅 <i>Gomphorena globosa</i>	—	—
菸草 <i>Nicotiana benthamiana</i>	M	M
菸草 <i>N. rustica</i>	NS	SNS
菸草 <i>N. sylvestris</i>	NS	SNS
菸草 <i>N. tabacum</i> var. White Burley 21	YS	SYS
秘魯酸漿 <i>Nicandra physaloides</i>	M	M
蘿蔔 <i>Raphanns sativus</i>	—	—
豇豆 <i>Vigna sinensis</i>	—	—

VBM=vein banding mottle. NS=necrosis spots.
SNS=systemic necrosis spots. YS=yellowing spots.
DVY=Deformation vein yellows. M=mottle mosaic.
SYS=systemic yellowing spots. —=no symptoms.

何差異，由此而知 YS 與 SYS 分離株為非常相近的病毒。

由於兩者在寄主範圍上無明顯的差異，因此另測定 YS 與 SYS 分離株病毒的耐稀釋性、耐熱性與耐保存性，結果如表四。

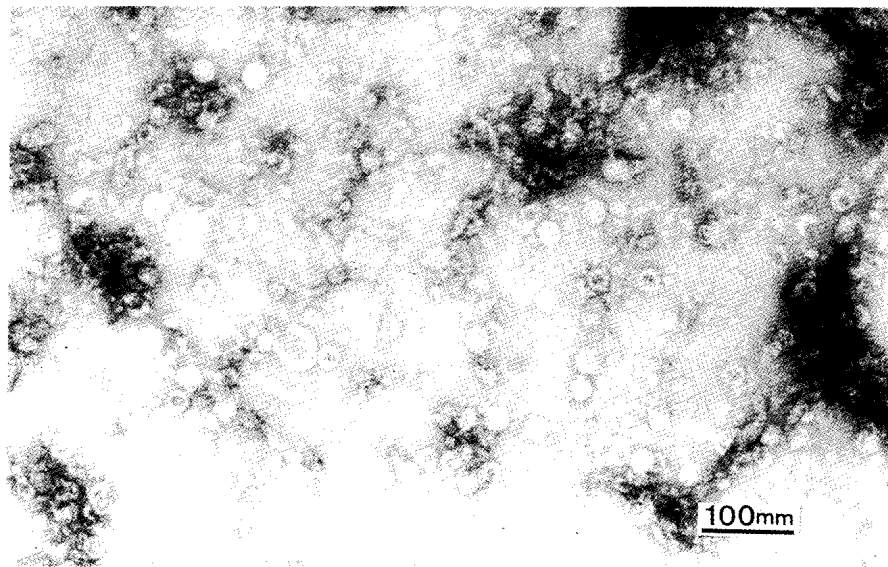
由表四結果得知，兩分離株在耐稀釋性上 SYS 分離株比 YS 分離株高出 100 倍以外，其餘性質皆相同，表示 SYS 分離株病原性較強或濃度較高。

接著將單離後 YS 與 SYS 兩分離株以 Potato virus Y mosaic strain (PVY); Chili veinal mottle virus (CVMV) 及 Pepper veinal mottle virus 等三種病毒抗血清所純化之抗體 IgG，利用酵素連結抗體雙抗體法 (Double antibody sandwich ELISA) 測定其反應，結果如表五所示。

由測定結果顯示甜椒所分離的 YS 與 SYS 分離株皆和 CVMV 抗血清有明顯的反應但和 PVY 及 PVMV 則無反應，由此可推知兩者應屬國外所發生的 Chili veinal mottle virus 相近或相同，而非 Pepper veinal mottle virus。

另外在 120,000-g 沉降試料，經 Sepharose CL-6B 色層分析純化，所得各不同吸收峰汁液接種，在具有病原性的第一吸收峰及其肩狀凸起處，在紅藜上所出現的斑點，前者以針狀小斑 (R1) 為多，而後者以大班 (R2) 為多，分別 R1 挑小斑；R2 挑大班，如此再分別經由紅藜的三次連續單斑分離，最後所得的 R1 與 R2 分離株，測試比較此兩種病毒在寄主範圍上的差異，結果如表六所示。

由表六寄主範圍測定得知，兩球形病毒的寄主範圍皆很廣，兩分離株的主要差別，在紅藜接種葉 R1 分離株第 3 天出現小型針狀斑點，R2 分離株第 5 天後出現黃褐色斑點；在萬桃花上，R1 分離株出現葉脈黃化與葉畸形嵌紋狀；R2 分離株只有在接種葉出現不明顯黃點，在曼陀蘿上，R1 分離株不感染；而 R2 分離株出現畸形嵌紋病徵，在煙草 *N. glutinosa* 上，



圖九、單一病斑分離前的電子顯微鏡下病毒粒子形態(對照組)。

Fig. 9. Electron micrograph of the virus particles before single lesion isolation (Control).

表四、YS與SYS甜椒病毒分離株之物理性質

TABLE 4. Physical properties of YS and SYS Sweet pepper virus isolates

Virus isolates	TIP (°C)	DEP	LIV (days)	
			Room temperature (26-28 °C)	4 °C
YS	50-60	$10^{-2} - 10^{-3}$	3-5	7-9
SYS	50-60	$10^{-4} - 10^{-5}$	3-5	7-9

TIP=Thermal inactivation point. DEP=Dilution end point. LIV=Saps longevity in vitro.

表五、YS與SYS分離株酵素連結抗體雙抗體法反應測試之吸收值

TABLE 5. Absorbance values of YS and SYS isolates reacted with antisera to some potyvirus by double antibody sandwich ELISA

Sera	Absorbance values at 405 nm		
	YS isolate	SYS isolate	Healthy check
PVY(M)	0.007	0.008	0.009
PVMV	0.007	0.008	0.010
CVMV	1.661	over 2	0.011

PVY(M)=Potato virus Y mosaic strain. CVMC=Chili veinal mottle virus. PVMV=Pepper veinal mottle virus.

R1分離株出現嵌紋；而R2分離株出現葉片畸型嵌紋，煙草W. B.前者只出現嵌紋病徵；而後者所出現的嵌紋，以後在嵌紋病徵上有明顯的綠泡(Green island or evoke mosaic)，在豇豆上R1分離株出現紅褐色小斑

表六、經由紅藜(*Chenopodium amaranticolor*)單斑分離後之R1與R2分離株的寄主範圍反應

TABLE 6. Host reactions of R1 and R2 isolates after single-lesion isolation from *Chenopodium amaranticolor*

Indicator plants	Isolates	
	R1	R2
甜椒 <i>Capsicum annuum</i>	M	M
(藍星)(Blue-star)		
紅藜 <i>Chenopodium amaranticolor</i>	L	L
胡瓜 <i>Cucumis sativus</i> (春燕)	SL	SL
萬桃花 <i>Datura metel</i>	DVY	CP
曼陀羅 <i>D. stramonium</i>	—	DM
番茄 <i>Lycopersicum esculentum</i>	FL	FL
菸草 <i>Nicotiana debnyii</i>	M	M
菸草 <i>N. glutinosa</i>	M	DM
菸草 <i>N. tabacum</i> var.		
White Burley 21	M	GM
秘魯酸漿 <i>Nicandra physaloides</i>	M	M
酸漿 <i>Physalis floridana</i>	M	M
矮牽牛 <i>Petunia hybrida</i>	M	M
豇豆 <i>Vigna sinensis</i>	BL	GL
蘿蔔 <i>Raphanns sativus</i>	—	—

M=Mosaic. L=Local lesion. DVY=Deformation vein yellowing. SL=Symptomless infection. DM=Deformation mosaic. FL=Fern leaf. CP=Chlorotic spots on inoculated leaves. GM=Green island mosaic. BL=Brown lesion. GL=Grayish lesion.

點；而R2分離株為灰白色斑點，其他寄主的病徵則無法區別，兩分離株病毒在寄主反應上，顯然有明顯的差別。

CMV 血清雙擴散反應

將色層分析純化後之 R1 與 R2 分離株病毒及其在煙草 W. B. 上的粗汁液供為抗原，和來自小黃瓜分離鑑定而來之 Cucumber mosaic virus (CMV) 抗血清，稀釋 2 倍、4 倍與 8 倍，分別置於瓊脂平板中央穴，進行雙擴散反應測試，結果在稀釋 2 倍與 4 倍的擴散凝膠盤內，皆能出現白色反應帶，而且 R1 與 R2 分離株間並未有 spur 產生，而健全煙草汁液為對照者則未有反應出現，而知兩分離株間，具有共同的抗原性，即兩分離株具有類緣關係存在。

討 論

本省甜椒的栽培，到了生長後期葉片普遍出現葉幅略變狹小而長之花葉斑駁嵌紋病徵 (veinal mottle mosaic)，由此為材料分離病毒時，往往在同一類型病徵中，由於植株的不同，汁液接種的結果其寄主反應也不盡完全相同 (2)，由此而知，侵入感染的病毒種類也有所不同，因此難從甜椒罹病葉所表現的病徵確定其為害病毒種類，所以從初期發病病徵上出現較多的脈綠斑駁嵌紋葉片為材料，汁液接種至表一所示判別植物，由寄主的病徵反應中，選用在甜椒接種苗上初發病出現較多的脈綠斑駁嵌紋病徵為材料，進行分離鑑定侵入為害之病毒種類。為了方便分離病毒的種類，選擇同時在煙草 W. B. 接種葉上出現最多的黃化斑點，而後期煙草 W. B. 心葉也會出現嵌紋者為材料，進行分離其入侵的病毒種類。首先將煙草 W. B. 接種葉所出現的斑點，任意篩選相距較遠的斑點 10 個，分別在原寄主進行單斑分離，經過系列的三次單斑分離接種，在 10 個單斑分離中，有三個單斑分離材料，除在接種葉出現黃斑外，以後新生葉也出現斑點而無嵌紋病徵，為要確定此種系統性的斑點 (SYS) 分離株，是否係人工接種所造成，或自然界也有所存在，因此另從田間同一區域新發病的脈綠斑駁嵌紋植株為材料，加以汁液接種測試，結果在 13 個材料中有 2 個除在接種葉出現黃斑外，新生葉也會出現斑點，由此而知此種系統性的 SYS 分離株，在自然界的田間也有所存在。

將 YS 與 SYS 分離株，分別接種在煙草 W. B. 上繁殖，再從其罹病葉純化病毒，以瞭解兩分離株在粒子形態上是否有所差異，結果兩者皆為 $740-760 \times 12$ nm 的長絲狀 Y 群病毒，是否同群的不同病毒，因此從物理性的耐熱性與耐保存性與耐稀釋性加以比較，所得的結果只有在耐稀釋性上 SYS 分離株高出 YS 分離株 100 倍，但是在等量材料下，在相同的純化方法所得純化試料，在電子顯微鏡下所能觀察到的病毒粒子，及在分光光譜儀下，260 nm 核蛋白的吸收光波

下的吸收值也未有明顯差異，而認為並非病毒濃度的差異，而是病原性的強弱的不同所致。又在現有的 PVY 及國外的 PVMV 與 CVMV (9,10) 三個 Y 群病毒血清反應測試中，兩分離株病毒只能和 CVMV 血清有所反應，而知本省所分離的甜椒 YS 與 SYS 分離株病毒與國外所報告的 Chili veinal mottle virus 相同，至於 SYS 分離株的呈色反應，如同兩者的耐稀釋性高出 YS 分離株甚多，認為國外的 CVMV 抗血清和國內的 SYS 分離株係屬同質 (Homologus) 反應所致。

另外將接種葉出現黃點，後期在同株煙草 W. B. 心葉所出現的明顯嵌紋病徵葉片為材料，採取其心葉的嵌紋病徵為材料，同樣汁液接種至紅藜、煙草 W. B. 與甜椒，結果在第 3-4 天紅藜接種葉上，出現大小不同的局部斑點，煙草第 10 天出現嵌紋，甜椒在第 8 天開始出現退綠斑駁嵌紋病徵。由於紅藜接種葉出現大小不同斑點，是否係不同病毒複合感染所引起，因此分別將小斑 (R1) 與大斑 (R2) 進行三重覆三次繼代單斑分離，最後接種在甜椒與煙草 W. B. 上，發現兩者在甜椒苗上皆出現退綠斑駁病徵，而煙草 W. B. 上，R1 分離株只出現嵌紋病徵，而 R2 分離株所出現的嵌紋卻有綠泡存在，即所出現的嵌紋病徵有明顯的不同。將小斑 (R1) 與大斑 (R2) 分離株，分別在煙草上所出現的病葉為材料純化病毒，在 120,000-g 沉降試料經 Sepharose CL-6B 分子篩孔色層分析分離，兩者都在波長 254 nm 監視下出現三個不同吸收峰，惟 R2 分離株在第一吸收峰處出現肩狀凸起，表示有分子量略異的成份存在，將此第一吸收峰第一管與肩狀凸起末一管及其它吸收峰試料，供電子顯微鏡觀察及汁液接種測定病原性，結果在第一吸收峰，觀察到 30 nm 大小的為主的球形粒子，而肩狀凸起末一管為 28-30 nm 大小的球形粒子存在，其它第二吸收峰為均一的核糖體樣的粒子；第三吸收峰為不定形的塊狀粒子存在，病原性測定結果，大小斑不同試料，前者在紅藜接種葉出現小形斑點，煙草 W. B. 出現嵌紋病徵，而後者在紅藜接種葉上出現大形斑點，煙草 W. B. 出現綠泡狀嵌紋病徵，而在甜椒苗上則出現難以區分的退綠斑駁病徵。從經由分子篩孔色層分析純化後，紅藜接種葉上所出現的局部斑點，再分別進行系列單斑分離，再同樣從煙草 W. B. 葉片進行相同純化的結果，在第一吸收峰的病毒粒子，明顯地為實心的 30 nm 大小的球形粒子 (圖七) 而無肩狀凸起存在。另外從大斑 (R2) 分離株接種的 W. B. 葉片純化，則第一吸收峰尚有明顯的肩狀凸起存在，電子顯微鏡觀察吸收峰前頭試料中為可見到 core 的 30 nm 球形為多；而後頭試料中也可見到 core 的大小 28 nm 為多球狀粒子存在 (圖八)，由此而知未經分子篩孔色層分析分離，直接汁液接種由紅藜單斑分離，雖然經過連續 5 次的單斑繼代分離，

尚難以將此大斑和小斑病毒完全分開，而經過分子篩孔色層分析後，將病毒粒子依其分子量大小分離後，再分別經過紅藜的同樣的單斑分離時，只要三次的單斑分離，則可以將此二種形態有所不同的粒子分開。但是在小斑病毒(R2)的分子篩孔色層分析純化後的罹病材料，經過多次重複試驗，在第一吸收峰處皆尚有肩狀凸起存在，分別再接再種，兩者在煙草出現明顯綠泡狀嵌紋病徵，而與小斑病毒(R1)只出現斑駁嵌紋而有所不同，由此推知大斑病毒(R2)分離株病毒，應屬於28-30 nm大小的多粒子性病毒而非複合感染。

再從R1與R2病毒分離株，由寄主範圍的測試，有如結果所述明顯的差異，從粒子形態大小在28-30 nm範圍，其寄主範圍又廣的球形病毒中，有Necrovirus，Tombusvirus，Fabavirus，Nepovirus，Cucumovirus，Ilarvirus等群的病毒屬之，但從寄主範圍測定所出現的病徵，在R1分離株病毒中，由於千日紅上不產生斑點，與奎藜上不發生系統性病徵而異於Tomato bushy stunt (12)，Tomato black ring與Tobacco ringspot病毒(21)；但是R1分離株在紅藜上所出現的大小斑病徵；奎藜上出現的斑點；煙草*N. glutinosa*上的斑駁嵌紋及豇豆上所出現的褐色斑點，卻和Cucumovirus群中Tomato aspermy virus極相似，只有在番茄上本病毒不發生腋芽增長，及病毒粒子緻密不見core的形態而與Aspermy virus有所不同，而與CMV較相同(16)，而認為本試驗分離所得的R1分離株病毒應屬不感染蔓陀蘿的CMV系統。另外R2分離株病毒在千日紅及矮牽牛上不產生斑點，煙草上不發生輪點，大豆、毛豆不產生病徵及對花生(臺南11號)有矮化現象，雖然和CMV抗血清雙擴散反應無spur出現，但是在寄主範圍R2分離株有如結果所述和R1病毒分離株有相當的不同，以及在病毒粒子形態上R2病毒粒子大小只有28 nm又可見到粒子core和CMV的病毒力粒子30 nm見不到粒子core的差異，而判定R2分離株病毒是同屬Cucumovirus群中的Peanut stunt virus (19)中的一系統較為適當。

謝 辭

本研究承農委會82-科技-2.3-糧-02，83-科技-2.4-糧-36經費補助，謹此誌謝。

引用文獻

1. 林納生. 1977. 甜椒嵌紋毒素病病原病毒-CMV之一系統之研究. 中興大學植物病理研究所第七屆碩士論文. 86頁。
2. 李成蕊. 1980. 臺灣甜椒毒素病病原分離與鑑定.

- 中興大學植物病理研究所第十屆碩士論文. 49頁。
3. 姚國山、盧耀村. 1993. 甜椒黃化輪紋斑點病之病原分離與鑑定. 植病會刊 2:57-65。
4. 陳滄海. 1982. 為害臺灣辣椒三種長形病毒之研究. 中興大學植物病理研究所第十二屆碩士論文. 86頁。
5. 小室康雄. 1973. 野菜のウイルス. 誠文堂. 300 pp。
6. 井本征夫、阪本庵、勵本比呂志. 1970. ピーマンのモザイク株から分離された四種のウイルスについて. 日植病報. 36:185 (要旨)。
7. 陳紀. 1973. 臺灣における植物ウイルス病ならびにマイコプラズマ病の電子顯微鏡的研究. 北海道大學博士學位論文. 204 pp。
8. Black, L. L., Green, S. K., Hartman, G. L., and Poulos, J. M. 1991. Pepper Diseases: A Field Guide. Asian Vegetable Research and Development Center, AVRDC Publication No. 91-347, 98 pp.
9. Brunt, A. A., and Kenten, R. H. 1971. Pepper veinal mottle virus-a new member of the potato virus Y group from peppers (*Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L.) in Ghana. Ann. Appl. Biol. 69: 235-243.
10. Brunt, A. A., Kenten, R. H., and Phillips, S. 1978. Symptomatically distinct strains of pepper veinal mottle virus from four west African solanaceous crops. Ann. Appl. Biol. 88:115-119.
11. Feldman, J. M., and Gracia, O. 1977. Pepper severe mosaic virus: a new potyvirus from pepper in Argentina. Phytopathol. Z. 89:146-160.
12. Fischer, H. U., and Lockhart, B. E. L. 1977. Identification and comparison of two isolates of tomato bushy stunt virus from pepper and tomato in Morocco. Phytopathology 67:1352-1355.
13. Fletcher, J. T., Wallis, W. A., and Davenport, F. 1987. Pepper yellow vein, a new disease of sweet pepper. Plant Pathol. 36:180-184.
14. Gracia, O., and Feldman, J. M. 1974. Tobacco streak virus in pepper. Phytopathol. Z. 80:313-323.
15. Green, S. K., and Kim, J. S. 1991. Characteristics and control of viruses infecting peppers: a literature review. Asian Vegetable Research and Development Center. Technical Bulletin No. 18, 60 pp.
16. Lockhart, B. E. L., and Fischer, H. U. 1976. Cucumber mosaic virus infections of pepper in Morocco. Plant Dis. Rep. 60:262-264.
17. Lockhart, B. E. L., and Fischer, H. U. 1977. Some properties of an isolate of broad bean wilt virus associated with a field disease of pepper in Morocco. Phytopathol. Z. 88:209-214.
18. Makkouk, K. M., and Gumpf, D. J. 1976. Characterization of potato virus Y strains isolated from pepper. Phytopathology 66:576-581.

19. Mink, G. I., Silbernagel, M. J., and Saksena, K. N. 1969. Host range, purification, and properties of the western strain of peanut stunt virus. *Phytopathology* 59:1625-1631.
20. Purcifull, D. E., Zitter, T. A., and Hiebert, E. 1975. Morphology, host range and serological relationships of pepper mottle virus. *Phytopathology* 65:559-562.
21. Stace-Smith, R. 1985. Tobacco ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 309. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 6 pp.

ABSTRACT

Huang, Y. T., Liu, H. L., and Lu, Y. T. 1994. The use of white burley tobacco for isolation of sweet pepper viruses. *Plant Pathol. Bull.* 3:91-100. (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Sweet pepper during the growing season were often affected with virus diseases. The diseased plants at the late growing stage usually showed severe mottle mosaic symptoms resulted from mixed infection; and it was difficult to isolate all causal viruses directly the mix-infected pepper plants. In an attempt to isolate viruses infecting pepper, the healthy pepper seedlings were planted in the field. From which the early infected leaves were collected and homogenized with 10 volumes of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), and each of the saps was mechanically inoculated to several differential plants. Different types of symptoms were observed on inoculated leaves of tobacco "White Burley" (W. B.) plants, and they were used as a source to isolate the causal viruses. Two virus isolates were obtained from chlorotic spots by single lesion isolation; one isolate produced chlorotic spots only on the inoculated leaves, while the other induced chlorotic spots on the inoculated and upper leaves. According to host ranges, physical properties, serological tests and particle morphology, they were considered as two different pathogenic strains of chili veinal mottle virus. Virus isolation was also conducted from green island mosaic leaves of the tobacco. The infected leaves were subjected to partial purification by differential centrifugation and sepharose CL-6B molecular sieve chromatography. The elution samples that showed absorption at 254 nm were examined with an electron microscope (EM) and sap-inoculated to pepper plants. The results showed that the infectivity appeared in the first fraction (R1) and the shoulder fraction (R2). The viruses in both fractions induced similar veinal mottle symptom on pepper leaves, but produced different symptoms on W. B. tobacco, *Nicotiana glutinosa* and *Datura metel*. EM examination revealed that the virions in R1 were isometric particles of 30 nm in diameter on which the virus core could not be observed; while those in R2 were isometric particles of 28 nm on which the virus core could be seen. Both viruses reacted with the cucumber mosaic virus antiserum in the double diffusion test. Based on the host reactions, virion morphology and serological tests, the R1 virus was concluded as cucumber mosaic virus and the R2 virus possibly as a strain of peanut stunt virus of the same cucumovirus group.

Key words: White Burley tobacco, virus isolation, sweet pepper virus, cucumovirus group.