

作物病毒病害診斷鑑定

鄭櫻慧^{1,5} 陳金枝² 周建銘³ 鄧汀欽⁴

摘要

植物病毒曾造成作物的重大損失，與其他植物病原不同，病毒病害無法以農藥加以防治，目前以抗病育種、健康種苗和防治媒介昆蟲為重要病害管理方法。觀察病徵加以分類判斷是何種病害是病害診斷的第一步，但大部分的病毒病害不易從病徵判斷感染的病毒種類，需要進行檢測，才能診斷係何種病毒感染造成病害。生物檢定法 (bioassay) 是最早應用作為植物病毒診斷與鑑定之技術為，接著有利用電子顯微鏡 (electron microscopy) 觀察感病植物體內的病毒顆粒為直接之鑑定。50 年代末期科學家開始利用抗血清檢定法 (serological methods) 進行病毒病的鑑定與診斷，至今仍為病毒診斷與鑑定的主要技術。血清檢定法的應用包含免疫擴散法 (immunodiffusion)、免疫漬染法 (immunoblotting)、組織壓片法 (tissue printing)、螢光免疫法 (immunofluorescence)、酵素連結免疫法(ELISA)、西方漬染法 (Western blotting) 及免疫試紙 (immunostrip) 等。除了利用抗體所進行之診斷方法外，近年也盛行核酸鑑定法 (nucleic acids methods)，例如核酸發生雜合法 (hybridization)、聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)、即時-聚合酵素連鎖反應 (real time-PCR)、生物晶片 (biochip) 與恆溫環狀擴增反應 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等。

關鍵詞：病毒、抗血清檢定法、核酸鑑定法。

前言

病毒由核酸包括去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 或核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 及蛋白質外鞘所組成之活體，其核酸於寄主細胞內利用其生合成系統進行複製繁殖並合成特有的鞘蛋白，再組合成一完整之病毒顆粒，其

-
1. 行政院農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
 2. 行政院農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
 3. 行政院農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
 4. 行政院農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。
 5. 通訊作者，電子郵件：yhcheng@tari.gov.tw；電話：(04) 23317517。

外形有桿狀、絲狀及球形等。感染植物的病毒稱為植物病毒，目前已知的植物病毒約有 1000 種以上，危害穀類、蔬菜、花卉、果樹等作物與觀賞植物等。植物病毒學家曾票選近年 10 大重要病毒 (Rybicki 2015)，台灣常見的番茄斑萎病毒 (Tomato spotted wilt virus, TSWV) (Yeh et al. 1992; Zheng *et al.* 2010)、番茄黃化捲葉病毒 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) (Jan *et al.* 2007; Tsai *et al.* 2011)、胡瓜嵌紋病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) (鄧 2011) 與馬鈴薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY) 都榜上有名，其中 TYLCV 和甜瓜黃斑病毒 (Melon yellow spot virus, MYSV) (與 TSWV 同一病毒屬) (Chen 2008) 更是引起設施栽培中重要的病毒病害。除了 TYLCV 及 MYSV 之外，南瓜捲葉菲律賓病毒 (Squash leaf curl Philippine virus, SLCPHV) (Liao *et al.* 2007; Tsai *et al.* 2007) 及瓜類褪綠黃化病毒 (Cucumber chlorotic yellows virus, CCYV) (Tseng *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010) 也是近年來常見於設施栽培由粉蝨傳播的病毒病害。

病毒侵入寄主植物之後，絕大部分造成系統性感染，在根、莖、葉，花及果實均有病毒存，也對其造成影響，如葉片呈現嵌紋、斑駁、皺葉、捲葉、黃化、褐化、壞疽斑、輪斑、條斑、簇葉，腫瘤或是節間縮短植株矮化，花瓣變色枯萎，果實品質劣變、脫落或縮小畸形等，嚴重者亦有生長停頓、枯萎或整株死亡。但是也有些植物感染病毒後並不顯現病徵，呈現潛伏性感染。目測觀察是判別是否為病毒病害最直接的方法，但病毒感染造成的病徵受季節與環境的影響，常因栽培管理與氣候條件不同，病徵嚴重程度不同。而同一病毒在不同作物或不同品種上的病徵往往不盡相同。有時病徵相似，但卻由不同病毒感染引起。尤其在田間常有複合感染的狀況發生，因此不容易以肉眼直接判斷為何種病毒危害，往往需要配合其他檢測方法進行診斷。茲將植物病毒常見的診斷方法 (詹 2002; Webster *et al.* 2014) 簡介如下：

生物診斷法 (Biological methods)

利用機械接種或嫁接等方式，使病毒感染指示植物。常見的指示植物包括紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、奎藜 (*C. quinoa*)、煙草 (*Nicotiana benthamiana*) 等。但此檢定方法必須有足夠的溫室空間和維護管理的人工，而且操作者必須有一定的經驗，否則檢定結果之成功率可能會造成誤判。可以利用機械接種的病毒如前述的 CMV、TSWV 及 MYSV 等，利用接種指示植物法的注意如指示植物的

齡期、金剛砂的粗細、緩衝接種液用量、研磨液至於冰上與接種後水洗葉面等注意事項以增加接種成功率。

無法機械接種的病毒如 SLCPHV 及 CCYV 等，則利用嫁接或靠接指示品種，觀察病徵加以判別。

生化診斷法 (Biochemical method)

生化診斷法指光學顯微鏡觀察法或組織化學染色法。有些病毒感染後，植物細胞內形成特有的內含體 (inclusion body)，取下葉片表皮，加以染色與褪色後，即可以高倍光學顯微鏡觀察寄主細胞內形成之內含體，內含體的形狀可作為判別依據 (陳 2001)。

電子顯微鏡觀察法 (Electron microscopy)

電子顯微鏡是觀察罹病植株是否有病毒顆粒作為判斷依據，另外，配合專一性抗體之應用之免疫電顯觀察法，也能提升電顯的敏感度。利用電子顯微鏡鏡檢最大的好處是可以直接觀察到病毒顆粒，但若未觀察到病毒顆粒不代表無病毒存在。又可分為直接陰染法 (Direct negative staining) 與免疫電顯觀察法 (Immuno-specific electron microscopy, ISEM)。

血清檢定法 (Serological methods)

常用的抗血清檢定法包括免疫擴散法 (SDS-immunodiffusion test)、酵素連結免疫法 (ELISA) 及免疫漬染法 (immunoblotting test)、免疫試紙 (immunostrip) 及石英晶體微量免疫感測器 (Quartz-Crystal-Microbalance immunosensors, QCMI) 等檢定方法。抗血清的來源可由實驗室自行製備或購自商業公司。實驗上常以純化的病毒、純化的鞘蛋白或病毒基因的表現蛋白作為抗原，免疫白兔或小鼠製備抗血清。

免疫擴散法雖然靈敏度不高，但由反應帶出現的位置、數目，以及反應帶間有否交錯，可以判斷不同檢體與抗原之間的異同。在抗原與抗體擴散相遇處會形成白色反應帶，若無相對病毒存在則無反應帶出現。

免疫漬染法為簡化的檢查方法，步驟是將檢體葉片捲成筒狀，刀片橫切後所得新鮮切面壓印在硝酸纖維膜上，與抗血清反應，再用酵素連結二次抗體反應後，浸入酵素基質溶液，若有呈色表示為陽性反應。

免疫試紙利用 1 次與 2 次抗體夾心方式的免疫膠體金層析技術，屬於一步式固相膜反應。試紙被滴加樣品溶液後，溶液中的抗原隨溶液爬行至結合墊處，與其中的膠體金標記抗體 1 反應形成紅色的抗原抗體複合物，然後繼續層析移動向前。在觀察窗口的檢測線處，紅色免疫複合物中的抗原被此處預先包被抗體 2 捕獲並截留下來，隨著紅色複合物截留量增多，逐漸形成一條紅線，因此根據紅色 T 線的出現即可判定樣品溶液為陽性。目前已有商業化生產此類試劑套組。

目前應用於植物病毒檢測以 ELISA 敏感度佳、結果重現性高、可以快速處理大量樣本等優點，在偵測上應用最為普遍，詳細操作方法及緩衝液配製方法如參考文獻 (Clark 1977)。

石英晶體微量免疫感測器原理與 ELISA 類似，以鍍膜的石英晶體取代 ELISA 的聚苯乙烯微量盤，利用質量負載(Mass-Loaded)原理，藉由生物辨識層的薄膜，利用分析儀器準確辨識出被偵測的病毒抗原的濃度，在蘭花病毒檢測上已有成功的報告 (Eun *et al.* 2002)。

分子診斷法 (Molecular methods)

分子診斷法包括核酸探針雜配法 (DNA probe hybridization) 與聚合酶連鎖反應法 (polymerase chain reaction, PCR) 兩大類。核酸檢查法雖然比 ELISA 敏感，但是技術門檻及成本費用也相對較高。核酸探針雜配法操作方法與免疫漬染法相近，利用與病毒核酸互補的一段核酸片斷做為試劑使其與供測病毒核酸發生雜配 (hybridization) 反應，其反應之結果以放射性或非放射性物質加以偵測出來。以 DNA 為偵測的對象稱為南方漬染法 (Southern blotting)，北方漬染法 (Northern blotting) 以 RNA 為偵測對象，點狀漬染法 (Dot blot hybridization) 不經過電泳分析，直接將樣品核酸點在膜上，進行雜合。偵測之抗體改為核酸探針，核酸探針聯結 DIG、Biotin 等，作為後續呈色之用。生物晶片 (Biochip) 將數千甚至數萬個點 (spot)-探針 (probe)，以高密度方式植在約拇指大小之晶片，利用互補核酸結合等特性做到同時大量偵測反應效果。

聚合酶連鎖反應利用 Taq 聚合酶自 DNA 模板擴增一小段已知的 DNA 片段，以 RNA 為模板時需先經反轉錄成爲互補 DNA，再以此爲模板透過 PCR 進行 DNA 複製，稱為 reverse transcription-PCR (RT-PCR)。PCR 另有各種變體: touchdown PCR: 前幾循環溫度逐漸下降; multiplex PCR: 在同一個反應中使用多組引子; nested

PCR：先用低特异性引子擴增幾個循環以增加模板數量，再用高特异性引子擴增；
real-time PCR：Real-time PCR 或稱 Quantitative PCR (Q-PCR)是一種藉著 PCR 操作協助定量 DNA or RNA (進行 RT-PCR) 濃度的方法。跟傳統 PCR 不同之處在於前者可經由光學系統去監測反應中產物量(螢光物質)的變化而反應在電腦上，後者則必須等反應結束後再進行洋菜膠體電泳分析。目前 Real-time PCR 螢光系統可大致分為「非探針型」及「探針型」2種。非探針型為在反應中加入會與雙股 DNA 嵌合而釋放螢光的物質，目前最常使用的為 fluorescence DNA binding dye SYBR Green，在 PCR 反應的過程中，隨著雙股 DNA 含量的增加，與 DNA 結合的 SYBR Green 亦增加，螢光訊號即隨之增加。探針型的原理為利用 PCR 產物的序列來設計一段互補的核酸探針，並在探針的兩端結合上兩能階相差很多的螢光物質，稱為 Reporter 及 Quencher，若探針在游離態時，由於 Reporter 及 Quencher 交互遮蔽使其不發光，當 DNA 被複製時，此探針被酵素水解後，Reporter 與 Quencher 分離，Quencher 失去其遮蔽效應導致 Reporter 發光而被偵測到。如果不是複製標的產物，探針就不會雜合到核酸上，也就不會釋放出螢光。使用探針系統，具有較好的專一性，且可以藉由不同的螢光波長及探針的配合，對於同一樣本同時進行多目標偵測 (multiplex detection)。

相較於 PCR 需要 3 個溫度循環以上的控溫儀器，重組聚合酶增幅 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) 只需要單管，等溫聚合的增幅技術。RPA 是要作為分子診斷技術開發的幾種等溫核酸擴增技術之一，包括 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)，Strand displacement amplification (SDA)，Helicase-dependent amplification (HDA)及 Nicking Enzyme Amplification Reaction (NEAR) 等，這些技術提供了快速檢測時間，恆溫的簡化儀器，與高靈敏度等優點，適合田間就地偵測。

上述檢測方法有些已商業化產品，有些在實驗室研發階段，未來會有更準確快速方便的檢測方法仍持續被開發出來，許多過去認為只適用於實驗室的方法，在可見的未來將會陸續被突破，希望日後病毒診斷與鑑定工作將更快速正確有效率。

設施栽培常見的病毒病害

台灣利用設施栽培蔬菜已行之有年，以常見的 32 目防蟲網構成的設施可以有效阻絕大部份害蟲入侵，因此此類設施中發生的害蟲，多數是粉蝨及薊馬等體型

小的昆蟲及蠕類。銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring) 傳播為害瓜類的南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*, SLCPHV)、瓜類褪綠黃化病毒 (*Cucumber chlorotic yellows virus*, CCYV) 及為害茄科作物的番茄捲葉病毒 (*Tomato leaf curl virus*, TLCV)、番茄黃化捲葉病毒 (*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*, TYLCTHV)；薊馬傳播 *Tospovirus* 屬的病毒，設施中常見如危害瓜類的甜瓜黃斑病毒 (*Melon yellow spot virus*, MYSV) 及危害茄科的 TSWV、CaCV (Huang *et al.* 2010) 及 Pepper chlorotic spot virus (PCSV) (Cheng *et al.* 2014)，往往造成農民嚴重的損失。相較於 *Tospovirus* 屬病毒以血清檢定法為主 (Chen *et al.* 2010)，屬於雙生病毒科豆類黃金嵌紋病毒屬的 SLCPHV、TLCV 及 TYLCTHV 以核酸檢定法為主 (Cheng *et al.* 2015)，最常見的非 PCR 莫屬，可以利用單一 PCR 或複合 PCR 進行檢測，以瓜類為檢測對象時，還可以與 CCYV 進行複合 RT-PCR，同步偵測 (圖 1)。

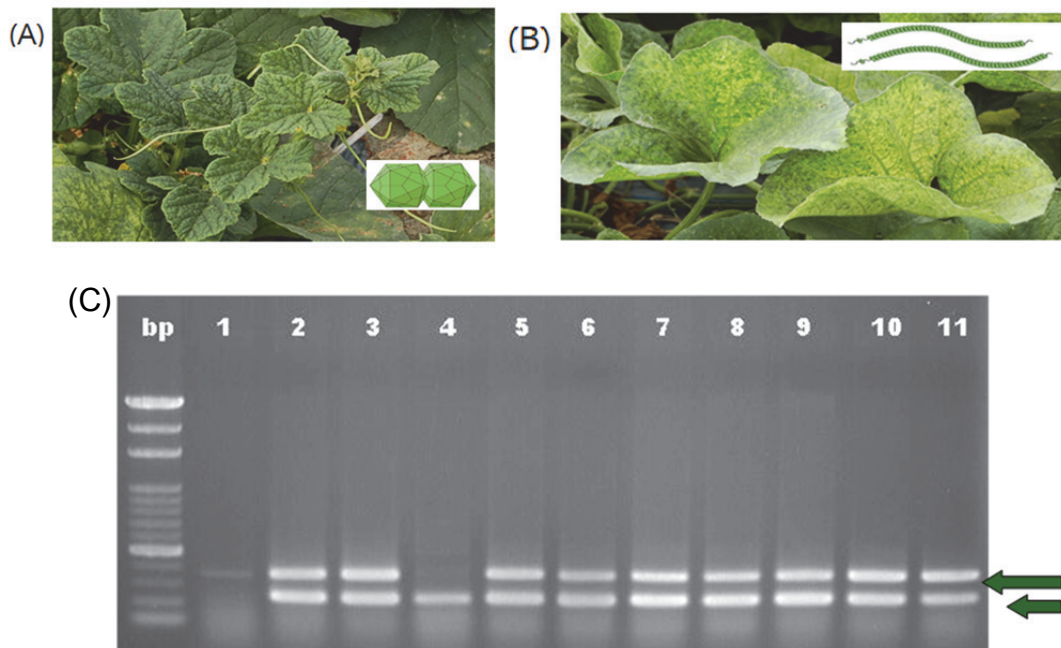


圖 1. 粉蝨媒介傳播的南瓜捲葉病毒 (A)，瓜類褪綠黃化病毒之病徵 (B) 及利用複合 RT-PCR 檢測 (C)。

Fig. 1. Symptoms caused by *Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV)(A) or *Cucurbit chlorosis yellows virus* (CCYV) which were transmitted by whitefly efficiently. Detection of SLCPHV and CCYV on cucurbitaceae samples by duplex RT-PCR (C), amplified fragments from SLCPHV (upper) and CCYV (lower) were indicated by arrow.

病毒病害防治

病毒病害診斷鑑定的方法日新月異，但病毒病害目前仍無法以藥劑防治，預防勝於治療為病毒病害管理的主要方法。以下 5 點相關工作都可以達到防治效果：(1) 使用健康種苗：幼苗期最容易感染病毒，在育苗期應加強媒介昆蟲，尤其針對蚜蟲、粉蝨及薊馬之管理。(2) 使用抗病品種：栽培抗病品種為最經濟有效防治病害手段之一。目前已培育許多番茄捲葉病的抗病品種，栽種抗病品種減低媒介昆蟲粉蝨的防治壓力。(3) 合理化施肥：施肥培管理，提供適合作物生長的健康環境，可使植物生長正常，植株強健而增加植物抵抗力。多施有機堆肥，增加植株生長勢，亦可減輕被害程度。(4) 田間衛生：拔除病株，勿使留置田間成為感染源。清除田間雜草，避免媒介昆蟲滋生於其上。(5) 媒介昆蟲管理：合理、有效及安全使用推薦用藥防治媒介昆蟲，或是利用設施栽培，隔離媒介昆蟲。採收期則可選擇天然植物保護資材或天敵來防治媒介昆蟲，減少病害發生 (林 2017; Jones 2006)。

雖然設施栽培有效發揮隔離大型害蟲的效果，但卻因其內高溫多濕、通風不良或光線不足等特殊環境，使薊馬或粉蝨等小型害蟲如更易孳生。因此在從事設施內作物病害防治時，須妥善採用各種栽培防治法、農藥及非農藥防治法等技術，才不會傷害人體健康、造成環境污染與農藥殘留，在社會大眾關注農產品安全的現在更為重要。

參考文獻

- 林鳳琪、陳怡如、鄭櫻慧、許秀惠。2017。建立設施番茄病蟲害綜合管理及安全生產模式。農業害蟲管理暨食安把關研發成果研討會專刊: 53-56。
- 陳慶忠、曹淑麗、徐惠迪。2001。利用光學顯微鏡、電子顯微鏡及血清學技術診斷洋桔梗壞疽病毒。植物病理學會刊 10:105-114。
- 詹富智、盧耀村、陳慶忠。2002。植物檢疫病毒偵測技術。植物重要防疫檢疫害蟲診斷鑑定研習會 (二) pp.35-52。
- 鄧汀欽。2011。三十年來台灣瓜類病毒病害的流行趨勢演變。農作物害蟲及其媒介病害整合防治技術研討會專刊 pp.147-164。
- Chen, T. C., Y.-Y. Lu, Y.-H. Cheng, C.-A. Chang and S.-D. Yeh. 2008. Melon yellow spot virus in watermelon: a first record from Taiwan. *Plant Pathology* 57:165.

- Chen T. C., Y. Y. Lu, Y. H. Cheng, J. T. Li, Y. C. Yeh, Y. C. Kang, C. P. Chang, L. H. Huang, J. C. Peng and S. D. Yeh. 2010. Serological relationship between Melon yellow spot virus and Watermelon silver mottle virus and differential detection of the two viruses in cucurbits. *Archives of Virology*, 155:1085–1095.
- Cheng, Y. H., H. C. Lin, and F. C. Lin. 2015. Development of primers for survey of whiteflies carrying leaf curl disease causing agents of muskmelon. *J. Taiwan Agric. Res.* 64:135–144. (in Chinese with English abstract)
- Cheng, Y. H., Zheng, Y. X., Tai, C. H., Yeh, J. H., Chen, Y. K. and Jan, F.J. 2014. Identification, characterisation and detection of a new tospovirus on sweet pepper. *Ann Appl Biol* 164, 107–115.
- Clarke, M. F. and A. N. Adams. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 1977: 34, 475–483.
- Eun, A. J.-C., L. Huang, F.-T. Chew, S. F.-Y. Li and S.-M. Wong. 2002. Detection of two orchid viruses using quartz crystal micro-balance (QCM) immunosensors. *J. Virol. Methods*: 71–79.
- Huang C.-H., Y.-X. Zheng, Y.-H. Cheng, W.-S. Lee and F.-J. Jan. 2010. First report of capsicum chlorosis virus infecting tomato in Taiwan. *Plant Disease* 94:1263.
- Huang, K. S., C. H. Tai, Y. H. Cheng, S. H. Lin, T. C. Chen and F. J. Jan. 2017. Complete nucleotide sequences of M and L RNAs from a new pepper-infecting tospovirus, Pepper chlorotic spot virus. *Arch Virol* 162: 2109–2113.
- Huang, L. H., H. H. Tseng, J. T. Li and T. C. Chen. 2010. First Report of Cucurbit chlorotic yellows virus Infecting Cucurbits in Taiwan. *Plant Dis.* 94, 1168.
- Jan, F. J., S. K. Green, S. L. Shih, L. M. Lee, H. Ito, J. Kimbara, K. Hosoi, and W. S. Tsai. 2007. First report of *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* in Taiwan. *Plant Dis.* 91:1363.
- Jones, R. A. C. 2006. Control of plant virus Diseases. *Adv. In virus Research* 67:205–224.
- Liao, J. Y., C. C. Hu, T. K. Lin, C. A. Chang, and T. C. Deng. 2007. Identification of Squash leaf curl Philippines virus on *Benincasa hispida* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16:11-18.
- Rybicki, R. T. 2015. A Top Ten list for economically important plant viruses. *Arch Virol* 160:17–20
- Shih S. L., W. S. Tsai, L. M. Lee, J. T. Wang, S. K. Green and L. Kenyon. 2010. First report of Tomato yellow leaf curl Thailand virus associated with pepper leaf curl disease in Taiwan. *Plant Disease* 94: 637.
- Tsai, W. S., S. L. Shih, S. K. Green, and F. J. Jan. 2007. Occurrence and molecular

- characterization of *Squash leaf curl Phillipines begomovirus* in Taiwan. *Plant Dis.* 91: 907.
- Tsai, W. S., S. L. Shih, L. Kenyon, S. K. Green, and F. J. Jan. 2011. Temporal distribution and pathogenicity of the predominant tomato-infecting begomoviruses in Taiwan. *Plant Pathol.* 60: 787-799.
- Tseng, H. H., T. C. Chen and L. H. Huang. 2009. Diagnosis and identification of a new emerging crinivirus on cucurbits. *Plant Prot. Bull.* 51: 132. (Abstract in Chinese)
- Webster, C. G., S. J. Wylie and M. G. K. Jones. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science* 86: 1607–1607.
- Yeh S.-D., Y.-C. Lin, Y.-H. Cheng, C.-L. Jih, M.-J. Chen and C.-C. Chen. 1992. Identification of tomato spotted wilt like virus infecting watermelon in Taiwan. *Plant Disease*, 76: 835–840.
- Zheng Y.-X., C.-H. Huang, Y.-H. Cheng, F.-Y. Kuo and F.-J. Jan. 2010. First report of Tomato spotted wilt virus in sweet pepper in Taiwan. *Plant Disease*, 94: 920.

Diagnostic Methods for Plant Virus Diseases

Ying-Huey Cheng^{1,5}, Chin-Chih Chen², Chien-Ming Chou³, Ting-Chin Deng⁴

Abstract

Plant viruses cause major losses to several agricultural and horticultural crops around the world. Unlike bacterium and fungus pathogens, there are no chemical methods available to control viruses and, consequently, the current measures rely on resistant breeding, healthy seedlings and control insect vectors to manage the viral diseases. Diagnostic methods for detection and identification of viruses are not reliable based only by symptomatology since many factors may affect the appearance of visible symptoms so that it is necessary to apply some more sensitive techniques to diagnosis or identify viral diseases. The first technology used to diagnose and identify plant viruses is bioassay, followed by electron microscopy. In the late 50's, scientists began to use serological methods for the identification and diagnosis of viral disease, still were the major technology for virus detection. In addition to the diagnostic methods performed by antibodies, nucleic acids methods have also been prevalent in recent years. It is expected that more detection methods will be developed in the future so that virus diagnosis and identification is no longer a complicated task. These advances will help to ensure that plant quarantine, disease-resistant breeding and disease management are implemented accurately and essential for sustainable agricultural development.

Key words : Virus, Serological methods, Nucleic acids methods

-
1. Associate Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 2. Assistant Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Assistant Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 5. Corresponding author, e-mail: yhcheng@tari.gov.tw; Tel:886-4-23317517.