12-2-7 2004/07/02 11:04 AM 頁面122

植物病理學會刊 12:122-132, 2003

引起洋桔梗黃化斑駁、嵌紋與矮化病徵之 *Tobamovirus* 鑑定

詹富智[1] 鄭尤琇[1] 趙佳鴻[2] 柯文華[2] 張清安[3] 陳慶忠[2,4]

1 國立中興大學植物病理學系
2 行政院農委會台中區農業改良場
3 行政院農委會台灣農業試驗所
4 聯絡作者：電子郵件 fjjan@nchu.edu.tw，傳眞：+886-4-8521140

接受日期：中華民國92年5月29日

摘 要

詹富智、鄭尤琇、趙佳鴻、柯文華、張清安、陳慶忠. 2003. 引起洋桔梗黃綠嵌紋與矮化病徵之 *Tobamovirus* 鑑定. 植病會刊12:122-132.

自台灣中、南部所栽培之洋桔梗 (*Eustoma russellianum* Don. Griseb) 採集呈現矮化、黃化斑駁、葉片黃綠間雜嵌紋及黃化斑點疑似病毒感染引起之異常植株，初步以醋酸鈾陰染罹病株葉片粗汁液並經由電子顯微鏡鏡檢觀察到一直桿狀，大小約300×18 nm之類似病毒顆粒，經單斑分離得到一洋桔梗病毒分離株(LV-3)。由感染LV-3之菸草葉片(*Nicotiana tabacum*)亦可純化出類似之病毒顆粒。將純化之LV-3病毒顆粒以SDS-PAGE電泳分析後，顯示該病毒具有一鞘蛋白(coat protein)，分子量約爲18 kDa。將分析後所得之蛋白分子另以西方轉漬法(Western blotting)分析，得知該蛋白與番茄嵌紋病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)之抗血清有正反應。進一步以雙向免疫擴散反應和間接酵素連結免疫法藉以分析洋桔梗病毒分離株LV-3與其他tobamoviruses的抗血清反應關係，結果顯示洋桔梗病毒LV-3與菸草嵌紋病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)及ToMV的抗血清均有反應。進一步針對ToMV及TMV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LV-3鞘蛋白基因並進行選殖及定序，將所得之480-nt (nucleotides)鞘蛋白基因核酸序列與基因庫(GenBank)中已發表之各ToMV及TMV分離株鞘蛋白基因序列進行比對分析，經比對後與ToMV各分離株間具84.6-99.4%之核酸序列相同度(nucleotide identity)及91.2 - 99.4%的胺基酸序列相同度(amino acid identity)，而與TMV各分離株間爲61.8 - 99.2%之核酸序列相同度及69.8 - 99.4%的胺基酸序列相同度。綜合以上試驗結果初步鑑定引起台灣洋桔梗黃化嵌紋與矮化病徵的LV-3爲一tobamovirus，此外本研究亦爲台灣首次發現*Tobamovirus*屬病毒可感染洋桔梗之報告。

關鍵詞：洋桔梗、菸草嵌紋病毒屬

緒 言

洋桔梗(*Eustoma russellianum* (Don.) Griseb)原產於美國中部內布拉斯加州(Nebraska)至德克薩斯州(Texas)一帶，屬龍膽科(*Gentianaceae*)的草本植物[6]。台灣於1968年自日本引進並在中部地區零星試種，是近年來發展快速的新興切花之一，其花形優美，花色有紫、白、黃、粉紅及白底鑲紫邊、粉邊等多種，清新嬌媚，且切花吸水性好，瓶插壽命長，頗受消費者歡迎[1,3]。近年來，因國內市場的需求，加上栽培技術的改進，生產地包括中部的埔里、后里、田尾、永靖、嘉義縣新港及屏東萬丹、鹽埔等地，全省累計栽培面積約40公頃。

國外經紀錄能感染洋桔梗之病毒至少有13種，包括菜豆黃化嵌紋病毒(*Bean yellow mosaic virus*, BYMV)[23,37]、蠶豆萎凋病毒(*Broad bean wilt virus*, BBWV)[30]、胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)[23,30,45]、洋桔梗壞疽病毒(*Lisianthus necrotic virus*, LNV)[29,30]、洋桔梗條紋病毒(*Lisianthus line pattern virus*, LLPV)[39]、菸草嵌紋病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)[23]、番茄嵌紋病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)[38]、番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)[40,49]、番茄黃化捲葉病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)[19]、鳶尾黃斑病毒(*Iris yellow spot virus*, IYSV)[35]、甘藷浸脈病毒(*Sweet*

12-2-7 2004/07/02 11:04 AM 頁面123

potato sunken vein virus, SPSVV)[20]、鳳仙花壞疽斑點病毒(*Impatiens necrotic spot virus*, INSV)[41]、菸草條紋病毒(*Tobacco streak virus*, TSV)[21]等，而台灣已紀錄發生之病毒種類有BYMV[8]、LNV[10,11,14]、BBWV[4,13]、CMV[12]、TSWV[17]及*Turnip mosaic virus* (TuMV)[9]等。

1997 春季於南投市、1998 春季於屏東萬丹、鹽埔及2000 年6 月於嘉義縣新港鄉等地發現部份田間洋桔梗植株矮化、葉片產生黃化斑駁、黃綠間雜嵌紋或黃化斑點等徵狀之異常植株，罹病葉片初步以2% 醋酸鈾陰染於電子顯微鏡下鏡檢均可觀察到300×18 nm 直桿狀之病毒顆粒。以酵素連結免疫反應(ELISA) 分析顯示洋桔梗上新分離之病毒與番茄嵌紋病毒(ToMV) 有血清類緣關係。Tobamoviruses 引起世界各地不同植物病害[24]，在台灣，文獻記載它可感染許多種經濟作物包括菸草、番茄、辣椒類、百香果等作物[2,7,27]，但感染洋桔梗則尚未見正式記錄。*Tobamovirus* 屬病毒顆粒爲直桿狀，大小爲300×18 nm，病毒含單一種鞘蛋白，分子量約17.5 kDa，其核酸基因組爲正極性單股核醣核酸約爲6.4 Kb[36,48]。Tobamoviruses 可經由機械、植物間接觸及少數種類可經由菸草以外的寄主種子等方式傳播，但不能經由花粉或媒介昆蟲傳播[24,36,48]。本文就洋桔梗上新分離之病毒株(LV-3) 經病毒顆粒形態、抗血清反應分析及鞘蛋白基因定序初步鑑定引起台灣洋桔梗黃綠嵌紋與矮化病徵是一個tobamovirus。

材料與方法

病毒分離與供試材料之準備

本試驗以2000 年6 月採集自嘉義縣新港鄉田間洋桔梗植株表現矮化、葉片產生黃綠間雜嵌紋及許多細小黃斑之葉片材料，初步以陰染法用電子顯微鏡鏡檢觀察發現有直桿狀病毒，並經indirect ELISA 分析與ToMV 抗血清產生專一性反應之植株葉片爲材料。供試葉片以2 倍量之含1% Na_2SO_3 之0.5 M 磷酸緩衝液(phosphate buffer, pH 7.4) 磨碎後，機械接種於奎藜(*Chenopodium quinoa* Willd.) 所產生之單斑經三次單離後，再回接於奎藜及系統性寄主*Nicotiana benthamiana Domin.* 及*N. tabacum* L. 供爲試驗接種源(以下簡稱爲LV-3)，部份材料則以甘油：磷酸緩衝液(1 : 1) 保存於-20 ℃ 備用。

電子顯微鏡觀察

陰染法係依據Christie *et al.* 之方法[16]進行。將3×3 mm 大小之感染LV-3 之病組織以3 - 5 滴之0.1 M 磷酸緩衝液切碎再以銅網吸附其汁液，或吸附純化之病毒懸浮液，經2% 醋酸鈾染色後以電子顯微鏡(JEM-200CX, JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) 在100 kv 下觀察。

病毒之純化

病毒之純化係依葉氏純化番茄嵌紋病毒的方法進行[5]。將機械接種LV-3 發病之新鮮菸草(*N. tabacum*) 葉片，置於-70 ℃ 之冰櫃中冷凍保存。冷凍後之菸草葉片組織100 g 以0.5 M 磷酸緩衝液(pH 7.2) (內含1% 2-mercaptoethanol) 混合(1 ml/g)，並以均質機(homogenizer) 打碎2 分鐘後，以雙層紗布過濾，過濾液於攪拌器中緩緩加入汁液量之8% 正丁醇(n-butanol) (v/v) 並繼續攪拌15 分鐘，經10,000 g 離心30 分鐘，取上澄液加入聚乙烯二醇(polyethylene glycol, PEG 6000) 使之含有4%，攪拌溶解後，靜置15 分鐘，再經10,000 g 離心15 分鐘，取沈澱並以原抽出液1 / 5 體積之0.01 M 磷酸緩衝液pH 7.2 加以懸浮溶解，再經10,000 g 離心15 分鐘。上澄液再加入PEG 使之含有4% 及NaCl 使之含有4% (w/v)，攪拌溶解，靜置15 分鐘，於10,000 g 離心15 分鐘。沈澱物以原抽出液1 / 20 體積之0.01 M 磷酸緩衝液pH 7.2 懸浮，再經10,000 g 離心15 分鐘。上澄液於68,000 g 離心60 分鐘。沈澱物以原抽出液之1 / 50 體積之0.01 M 磷酸緩衝液懸浮溶解，再經10,000 g 離心5 分鐘，所得上澄液即爲純化病毒，純化病毒收量則依Dijkstra and De Jager[22]所述之方法估算。

抗體來源

血清學試驗使用之抗血清包括直桿狀粒子之ToMV、TMV、齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) 及胡瓜脈綠斑紋病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) 等。其中TMV、ToMV 及CGMMV 之抗血清爲中興大學植病系參與之實驗室所製備，ORSV 之抗血清及部份試驗之ToMV 抗血清由台灣農業試驗所參與之實驗室製備。

SDS-雙向免疫擴散反應

SDS-雙向免疫擴散反應主要依Jan and Yeh[32]之方法進行，取12 ml 內含0.5% SDS 及1% NaN_3 之0.8% 瓊脂溶液置於直徑九公分之培養皿使成瓊脂平板，置於4 ℃ 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 μl 抗原，周圍洞分別加入不同供試抗血清，於室溫下進行18 - 36 小時之擴散反應，所使用之抗體包括ToMV、TMV、ORSV 及CGMMV 等抗血清。供試抗原爲接種LV-3 發病之洋桔梗葉片粗汁液，並以未接種之健康葉片粗汁液作爲對照。

酵素連結免疫分析

以TMV、ToMV、ORSV 及CGMMV 等四種病毒抗體免疫球蛋白(IgG) 與感染LV-3 之罹病葉粗汁液抗原進行酵素連結免疫反應試驗。間接酵素連結免疫反應試驗(indirect ELISA)[33]，罹病組織以塗覆緩衝液(coating

12-2-7 2004/07/02 11:04 AM 頁面124

buffer) (15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, 0.02% NaN_3, pH 9.6) (10 ml/g) 研磨，並經10 倍系列稀釋，取200 μl 置於微量盤之孔穴中，37 ℃ 靜置一小時後以PBST (137 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 8 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, 2.7 mM KCl, 0.02% NaN_3, pH 7.4) 水洗，再加入以結合緩衝液 (conjugate buffer) (含2% PVP-40, 0.2% ovalbunin 之 PBST) 稀釋1000 倍之供試病毒抗體之免疫球蛋白 (IgG)，37 ℃ 靜置反應一小時後再以PBST 水洗，再加入稀釋5000 倍之鹼性磷酸酵素標示之山羊抗兔子免疫球蛋白 (goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Jackson Immuno Research Lab. Inc., USA)。而DAS-ELISA 依Clark and Adams 之方法進行[18]，依序加入供試病毒兔子抗血清球蛋白 (1 : 1000)、LV-3 粗汁液抗原以及IgG-alkaline phosphatase conjugate (1 : 1000)。兩種方法最後均於37 ℃ 靜置1 小時或4 ℃ 過夜，水洗後，每穴加入200 μl 以受質緩衝液 (substrate buffer) (9.7% diethanolamine, 0.2% NaN_3, pH 9.8) 配製之酵素基質 (ρ-nitrophenyl phosphate, 1 mg/mL) 溶液反應10 - 60 分鐘，最後每穴再加入50 μl 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 倍爲正反應之判定依據。

西方轉漬法

西方轉漬法(Western blot) 分析時，係根據Gooderham [26] 之方法。將純化之LV-3 病毒經SDS-PAGE 電泳後，以蛋白轉印槽 (Bio-Rad mini electroblot cell) 轉漬於轉漬膜 (PVDF membrane, Millipore)，並與ToMV 病毒之抗體IgG 反應，再以鹼性磷酸酵素之山羊抗兔子免疫球蛋白 (alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG, Sigma) 進行抗原抗體反應，最後轉漬膜置於7.5 ml 呈色緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$)，內含50 μl NBT (nitro blue tetrazolium, 50 mg/ml in 70% dimethylformamide) 及25 μl BCIP(bromo-chloroindolyl phosphate, 50 mg/ml in 100% dimethylformamide) 進行呈色反應10 - 30 分鐘，電泳時以Protein Standard Marker (BIO-RAD #161-0362) 爲分子量大小之標誌。

總量核醣核酸 (total RNA) 之抽取

將接種LV-3 之菸草 (*N. benthamiana*) 100 - 400 mg 以液態氮研磨後，加入500 μl 緩衝液 (solution R, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% SDS) 以抽取總量核醣核酸[42]，經酚/ 氯仿 (phenol/chloroform) (各250 μl) 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 μl 0.3 M NaOAC (sodium acetate) 溶解沉澱物後加入250 μl 100% 酒精，於 -80 ℃ 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 (diethylene pyrocarbonate) 處理過之無菌水溶解沉澱物即爲總量核醣核酸，置於 -80 ℃ 備用。

反轉錄-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

依據已經發表之 ToMV 及 TMV 鞘蛋白基因 (coat protein) 核酸序列 (AF332868、AJ011934、AJ132845、X02144、AF012917、AF062519) 來設計引子對 (primers)，以此引子對對接種LV-3 之菸草 (*N. benthamiana*) 葉片組織所萃取出之總量核醣核酸作爲模板，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 FJJ2001-9 之序列爲5'- GCGAGCCATGGATTCTTACTCAATTACT-3'，下游引子FJJ2001-10 之序列爲5'- ACTCTCGGATCCTTAAGATGCAGGTGCAGA-3'。進行RT-PCR 時，於總量RNA 中加入1 μl 之200 ng / μl FJJ2001-10 及DEPC-treated water 混和成總體積16 μl，於80 - 90 ℃ 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 μl (10 U / μl) M-MLV reverse transcriptase、2.5 μl 10X reverse transcription buffer、2 μl 2.5 mM dNTP、3 μl 0.1 M DTT、及0.5 μl RNasin (40 U / μl) 於前混合液內，於42 ℃ 30 分鐘及 37 ℃ 30 分鐘的條件下進行第一股cDNA 之合成。之後取5 μl 上述之cDNA、各1 μl 之200 ng / μl FJJ2001-9 / FJJ2001-10 引子對、*Taq* DNA polymerase 0.5 μl (5.0 U / μl)、10 μl 10X *Taq* reaction buffer [500 mM KCl, 17.5 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1% Triton X-100]、2 μl 2.5 mM dNTP 及無菌水使成100 μl 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., Watertown, Massachusetts) 進行PCR 增幅反應。首先於93 ℃ 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爲93 ℃ 變性反應1 分鐘，50 ℃ 黏合 (annealing) 反應1 分鐘，72 ℃ 聚合反應2 分鐘，最後再於 72 ℃ 進行延長 (extension) 聚合反應10 分鐘[31]。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[46]。

LV-3 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爲預期之核酸序列，因此進一步將RT-PCR 的產物利用TOPO TA 選殖套組(TOPO TA cloning kit) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 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, Sunnyvale, CA) 抽取質體 DNA，先以限制

12-2-7 2004/07/02 11:04 AM 頁面125

酵素 *Eco*RI 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, Cleveland, OH) 以 dideoxy-chain termination 方式[47] 進行解序，以進一步確認爲正確之選殖株，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爲預期之病毒序列，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 ToMV 及 TMV 之鞘蛋白基因序列進行比對分析。

結　果

病徵與寄主反應

本試驗自台灣中、南部包括南投縣南投市、嘉義縣新港鄉及屏東縣萬丹、鹽埔鄉等地之洋桔梗園均能零星採集到感染 tobamoviruses 之植株，不同地區採集之病株病徵並不完全相同，主要徵狀包括植株矮化、葉片呈黃化斑駁、黃綠間雜嵌紋或黃化壞疽斑點等，罹病葉片明顯變小，部份病株莖幹呈捲曲狀，爲系統性感染 (圖一A)。在溫室以奎藜進行三次單斑分離所後得洋桔梗病毒 LV-3 分離株，LV-3 以奎藜繁殖，於室內 (25 - 30 ℃) 以罹病奎藜葉片粗汁液機械接種洋桔梗幼株葉片，約於接種後 6 - 8 天開始於接種葉出現黃暈斑現象，約經二週開始出現黃化斑點，並逐漸轉變成壞疽斑點出現，最後造成全株系統性病徵 (圖一B)。

電子顯微鏡觀察

田間發病之洋桔梗葉片粗汁液以醋酸鈾做陰染，於電子顯微鏡可觀察到寬幅約 18 nm、長度 280 - 320 nm、平均 300 nm 之直桿狀病毒顆粒 (圖二A)。機械接種 LV-3 發病之菸草 (*N. tabacum*) 經純化後之病毒試料，同樣利用陰染法於電子顯微鏡下也可觀察到類同之直桿狀病毒顆粒，另有部份較短長度不一之顆粒 (圖二B)。相同方法觀察未接種之健康 *N. tabacum* 則未發現類似之顆粒。

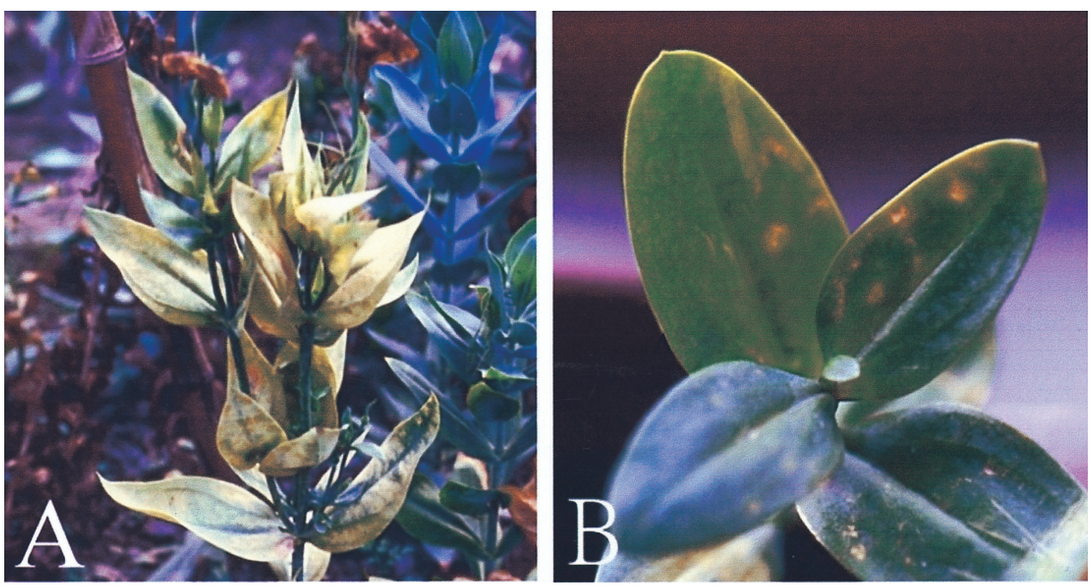
病毒之純化及病毒鞘蛋白分子量測定

洋桔梗病毒 LV-3 經方法所述純化後之病毒樣品在分光光譜儀 (spectrophotometer) 測其紫外光吸收曲線在 261 nm 及 249 nm 處分別出現最高 (A_{max}) 及最低吸收值 (A_{min})。A260 / A280 比值爲 1.38，依 Dijkstra and De Jager [22] 估算病毒收量爲每 100 公克菸草材料約可純化 46 mg 病毒。

純化之病毒經以西方轉漬法 (Western blotting) 分析，其單一鞘蛋白可與 ToMV 抗血清產生專一性反應帶，與標記蛋白比對，估算其相對分子量約爲 18.0 kDa (圖三)。

血清學關係測定

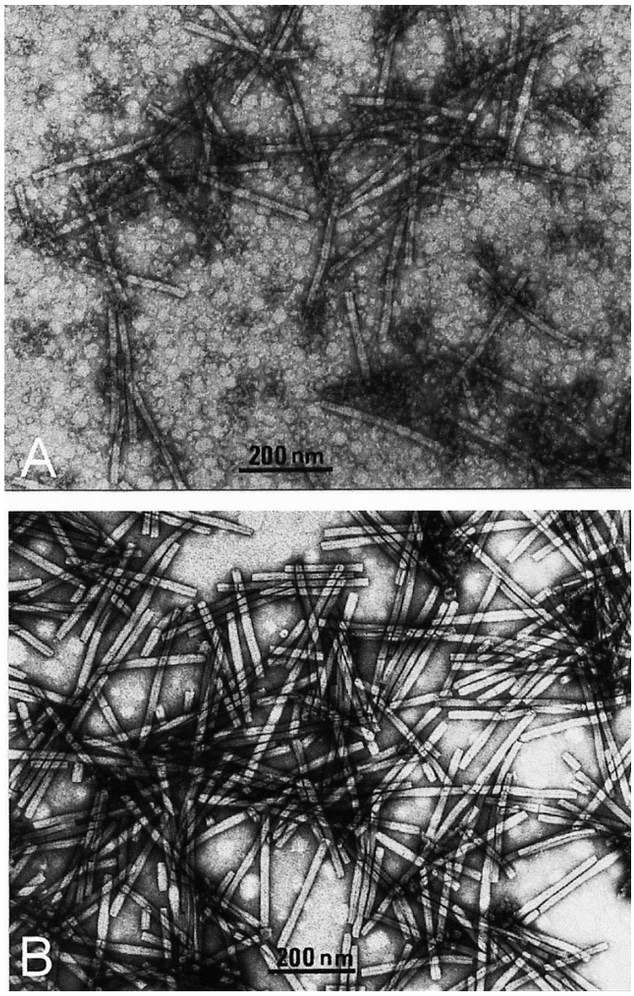
爲探討洋桔梗病毒 LV-3 與其他 tobamoviruses 的血清反應關係，將 LV-3 與 TMV、ToMV、ORSV 及 CGMMV 等 tobamoviruses 的抗血清以不同分析方法分析其間的血清關係。雙向免疫擴散反應 (SDS-immunodiffusion test) 的結果顯示 LV-3 與 ToMV 及 TMV 抗血清產生沉澱反應，且



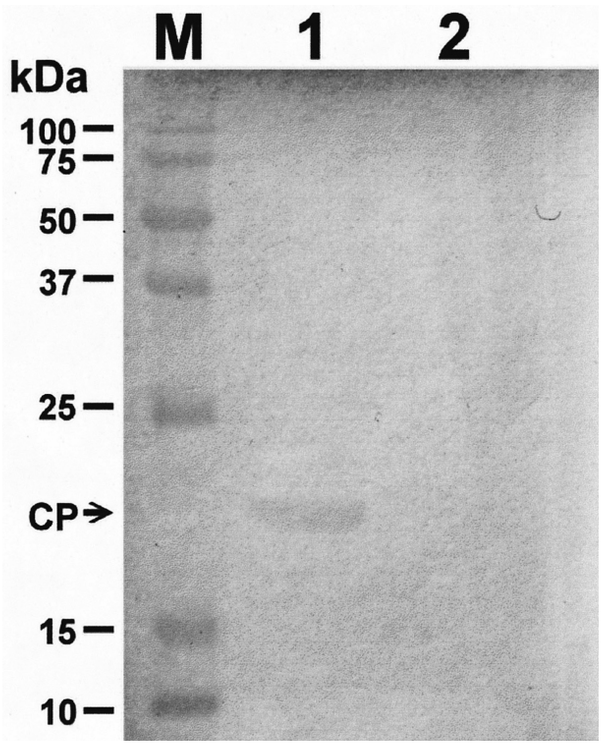
圖一、洋桔梗病毒 LV-3 在洋桔梗植物之病徵。A. 田間罹病洋桔梗顯示葉片黃化、斑駁及壞疽斑點之病徵。 B. 純化病毒汁液機械接種洋桔梗幼株顯現葉片黃化及黃化壞疽斑點之病徵。

Fig 1. Symptoms induced by LV-3 isolated from *Lisianthus russellianum*. A, Field grown lisianthus plant showing yellow mottling on leaves. B, A seedling of lisianthus inoculated with LV-3 showing yellowing necrosis spots and yellowing on leaves.

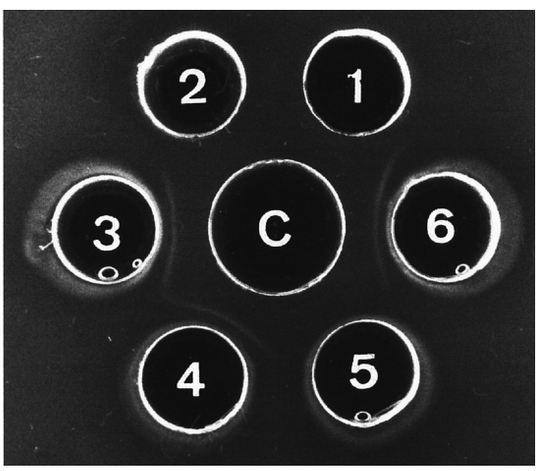
12-2-7 2004/07/02 11:04 AM 頁面126



圖二、洋桔梗病毒LV-3陰染之電子顯微鏡圖。
Fig. 2. Electron micrographs of a 2% uranyl acetate negatively stained LV-3 from(A)leaf dip preparation of infected *Nicotiana benthamiana*, (B) purified from infected *N. tabacum*.



圖三、西方漬染法分析洋桔梗病毒LV-3分離株之鞘蛋白。
Fig. 3. Western blotting of coat protein of lisianthus isolate LV-3. Lane 1, purified virions; lane 2, crude sap of healthy lisianthus leaf; lane M, protein markers.



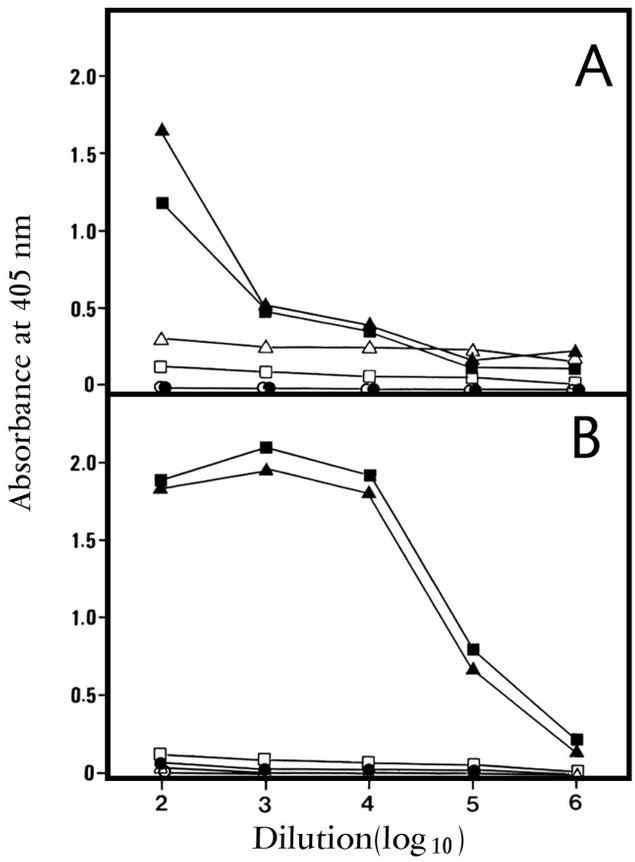
圖四、利用免疫擴散反應測定洋桔梗病毒LV-3分離株之血清類緣關係。感染LV-3之洋桔梗葉片粗汁液抗原(中央穴C)；胡瓜脈綠斑紋病毒抗血清(第一穴)；齒舌蘭輪斑病毒抗血清(第2穴)；番茄嵌紋病毒抗血清(第3穴及第6穴)；菸草嵌紋病毒抗血清(第4穴)；未免疫兔子血清對照(第5穴)。
Fig. 4. Serological relationship among lisianthus isolate LV-3 and other tobamoviruses in immuno-diffusion test. Crude saps of LV-3 infected lisianthus leaf (central well C); antisera against *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) (well 1), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) (well 2), *Tomato mosaic virus* (ToMV) (well 3 and 6), and *Tobacco mosaic virus* (TMV) (well 4); Normal rabbit serum (well 5).

沉澱帶交接處均呈平滑狀(圖四)，顯示LV-3與ToMV及TMV間有血清反應關係；LV-3與ORSV及CGMMV則無沉澱反應產生(圖四)。本試驗亦以TMV、ToMV、ORSV及CGMMV等四種病毒抗體免疫球蛋白(IgG)與感染LV-3之罹病奎藜葉片粗汁液爲抗原進行間接酵素連結免疫反應(indirect ELISA)結果，LV-3抗原與TMV及ToMV抗體有正反應(圖五A)。夾層酵素連結免疫反應(DAS-ELISA)結果顯示LV-3抗原亦同時與TMV及ToMV抗體有正反應；但與ORSV及CGMMV之抗體則無反應(圖五B)。以上結果顯示本試驗自洋桔梗上分離之LV-3與TMV及ToMV之血清類緣關係極爲相近似，但與ORSV及CGMMV則無血清類緣關係。

鞘蛋白基因之選殖及核酸序列定序與分析

利用接種LV-3之菸草罹病葉所抽取之總量RNA爲模板，以引子FJJ2001-10經反轉錄爲cDNA後，再以此

12-2-7 2004/07/02 11:04 AM 頁面127

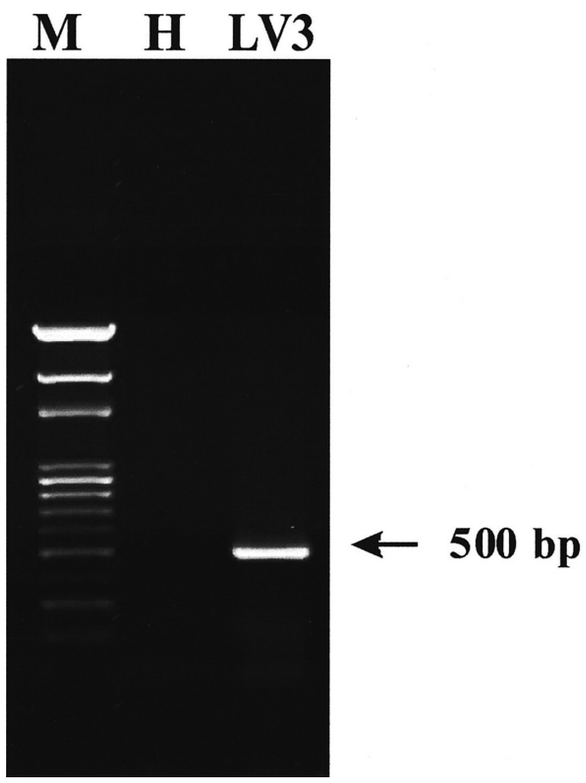


圖五、以間接酵素聯結免疫分析法 (A) 及夾層酵素聯結免疫分析法 (B) 分析洋桔梗病毒分離株 LV-3 與四種病毒間之血清類緣關係。以感染 LV-3 之洋桔梗葉片粗汁液爲抗原與 TMV (■)、ToMV (▲)、ORSV (△) 及 CGMMV (□) 等抗血清進行血清學酵素聯結免疫分析。供試抗血清稀釋倍數 1：1000，抗原稀釋倍數 1：100，鹼性磷酸酵素結合之山羊抗兔子免疫球蛋白稀釋 5,000 倍。未免疫兔子血清 (●) 及洋桔梗健康葉片粗汁液 (○) 做爲對照。

Fig. 5. Serological relationships among the lisianthus isolate LV-3 and four other tobamoviruses analyzed by indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (A) and DAS-ELISA (B). Antigens in tissues of *Chenopodium quinoa* infected with LV-3 were extracted and diluted at 1:100 in coating buffer. Antisera against TMV (■), ToMV (▲), ORSV (△) and CGMMV (□) were diluted at 1:1000. Goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase was used at 1:5000 dilution in indirect ELISA and IgG-alkaline phosphatase conjugate (1:1000) was used in DAS-ELISA。 Normal rabbit serum (●) and crude sap of healthy lisianthus leaf (○) were used as control.

cDNA 產物爲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，所得結果爲增幅出約 0.5 kb 之 DNA 片段，該 DNA 片段大小與 480 bp 大小之 TMV 及 ToMV 鞘蛋白基因相符，而以健康菸草所抽取之總量 RNA 爲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)。

爲證實 RT-PCR 所增幅約 0.5 kb 之 DNA 片段是否爲 TMV 或 ToMV 之鞘蛋白基因，經 TOPO TA 選殖套組 (Invirtogen, Carlsbad, CA) 選殖後，以限制酶 *Eco*RI 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 480 bp 之鞘蛋白基因 (圖七)，不含終止碼共對映產生一個 17.74 kDa 含 159 胺基酸的蛋白，與預估及 SDS-PAGE、西方轉漬法的結果相符 (圖三)。LV-3 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 ToMV 及 TMV 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 ToMV 鞘蛋白基因序列具有 84.6 - 99.4% 之序列相同度, 胺基酸序列則具有 91.2 - 99.4% 之相同度 (表一) 而與TMV鞘蛋白基因序列具有 61.8 - 99.2% 之核酸序列相同度 (identity) 及 69.8 - 99.4% 之胺基酸序列相同度 (表一)。其中與 ToMV 的代表分離株 ToMV-OM [43] 鞘蛋白基因序列具有 99.2% 之核酸序列相同度及 99.4% 胺基酸序列相同度 (表一)；而與二個典型的 TMV 分離株 U1 及 vulgare [25] 鞘蛋白基因序列則只具有 74.4% 之序列相同度及 83.9% 之胺基酸序列相同度 (表一)。



圖六、RT-PCR 增幅 LV-3 分離株鞘蛋白基因。

Fig. 6. Electrophoretic analysis of RT-PCR amplified product of the lisianthus isolate LV-3 coat protein gene. A product of ~500 bp was amplified from total RNA extracted from *N. benthamiana* leaves infected with LV-3 (lane LV3) by RT-PCR using primers FJJ2001-9/FJJ2001-10. Lane M: Gen 100 DNA ladder, lane H: total RNA from healthy *N. benthamiana*.

12-2-7 2004/07/02 11:04 AM 頁面128


```
ATGTCTTACTCAATTACTTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTCATCTGTATGGGCTGAC  60
 M  S  Y  S  I  T  S  P  S  Q  F  V  F  L  S  S  V  W  A  D

CCTATAGAATTGTTAAACGTTTGTACAAATTCGTTAGGTAACCAGTTTCAAACACAGCAA 120
 P  I  E  L  L  N  V  C  T  N  S  L  G  N  Q  F  Q  T  Q  Q

GCAAGAACTACTGTTCAACAGCAGTTCAGCGAGGTGTGGAAACCTTTCCCTCAGAGCACC 180
 A  R  T  T  V  Q  Q  Q  F  S  E  V  W  K  P  F  P  Q  S  T

GTCAGATTTCCTGGCGATGTTTATAAGGTGTACAGGTACAATGCAGTTTTAGATCCTCTA 240
 V  R  F  P  G  D  V  Y  K  V  Y  R  Y  N  A  V  L  D  P  L

ATTACTGCATTGCTGGGGGCTTTCGATACCAGGAATAGAATAATCGAAGTAGAAAACCAG 300
 I  T  A  L  L  G  A  F  D  T  R  N  R  I  I  E  V  E  N  Q

CAGAGTCCGACAACAGCTGAAACGTTAGATGCTACCCGCAGGGTAGACGACGCTACGGTT 360
 Q  S  P  T  T  A  E  T  L  D  A  T  R  R  V  D  D  A  T  V

GCAATTCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTAATGAACTAGTAAGAGGTACTGGACTGTAC 420
 A  I  R  S  A  I  N  N  L  V  N  E  L  V  R  G  T  G  L  Y

AATCAGAATACTTTTGAAAGTATGTCTGGGTTGGTCTGGACCTCTGCACCTGCATCTTAA 480
 N  Q  N  T  F  E  S  M  S  G  L  V  W  T  S  A  P  A  S  .
```

圖七、LV-3 分離株鞘蛋白基因之核酸及胺基酸序列。
Fig. 7. The nucleotide sequence of lisianthus isolate LV-3 coat protein gene and its deduced amino acid.

討 論

本試驗於 1997 年春季於南投、屏東萬丹、埔鹽洋桔梗園發現部份植株矮化、葉片產生黃化斑駁或黃化斑點徵狀及 2000 年於嘉義新港之洋桔園採集到部份植株葉片產生黃綠間雜嵌紋及許多黃化針狀小斑點之異常植株，初步以電子顯微鏡觀察得類似 TMV 的 300×18 nm 桿狀病毒顆粒，再以 indirect ELISA 測試結果顯示該桿狀病毒與 ToMV 具血清類緣關係。將此新分離之洋桔梗病毒 LV-3 進一步以 SDS-雙向免疫擴散反應、ELISA及鞘蛋白基因之選殖並解序，初步鑑定引起台灣洋桔梗黃化嵌紋與矮化病徵爲一 tobamovirus。

分析病毒鞘蛋白胺基酸鹽基序列作爲 *Tomamovirus* 分群 (group) 的依據是最方便、實用的方法。Hollings and Huttinga [28] 以鞘蛋白 (ＣＰ) 資料經電腦分析這些病毒群之關係結果與血清學上之專一性相當符合，其中以 TMV 與 ToMV 關係最接近，與 Sunn-hemp mosaic virus (SHMV) 次之，而與 ORSV 及 Sammon's Opuntia virus (SOV) 之關係則較遠，其中與CGMMV之關係也最遠；血清學上之關係 TMV 與 ToMV 較爲接近，而與 CGMMV 之關係最遠。本試驗以洋桔梗上新分離之 LV-3 爲抗原與 TMV、ToMV、ORSV 及 CGMMV 等抗血清進行 DAS-ELISA、indirect ELISA 及 SDS-immunodiffusion 分析結果，LV-3 抗原與 TMV、ToMV 抗血清在 DAS-ELISA, indirect ELISA 及 immunodiffusion 分析均產生正反應，其血清類緣關係最接近；其與 ORSV 及 CGMMV 則無血清類緣關係 (圖四、五)，此結果與 Hollings and Huttinga [28] 之分析結果相近似。以 LV-3 之純化試料進行西方漬染法分析，其鞘蛋白與 ToMV 抗血清產生專一性反應，該鞘蛋白之分子量約 18 kDa 與 tobamovirus 之鞘蛋白分子量相似 [28,48]。根據以上病毒顆粒形態及血清學等試驗資料初步鑑定從洋桔梗上新分離之 LV-3 病毒分離株應爲 *Tobamovirus* 屬之病毒，但從抗血清反應、病毒形態並無法判別 LV-3 爲 ToMV 或 TMV。因此以 ToMV 及 TMV 鞘蛋白基因專一性引子對進行反轉錄-聚合酶連鎖反應增幅 LV-3 鞘蛋白基因再經選殖定序，所得選殖株之核酸序列與 NCBI 之 GenBank 已發表之 ToMV 的鞘蛋白基因具有較高的核酸相同度 (84.6 - 99.4%) 及胺基酸相同度 (91.2 - 99.4%)，而與TMV之鞘蛋白基因具較低的核酸序列 (61.8 - 99.2%) 及胺基酸序列 (69.8 - 99.4%) 相同度 (表一)。其中與 ToMV 的代表分離株 ToMV-OM [43] 鞘蛋白基因序列具有 99.2% 之核酸序列相同度及 99.4% 胺基酸序列相同度 (表一)；而與二個典型的 TMV 分離株 U1 及 vulgare [25] 鞘蛋白基因序列具有 74.4% 之核酸序列相同度及 83.9% 之胺基酸序列相同度 (表一)，因此以鞘蛋白的核酸序列與胺基酸序列分析顯示 LV-3 有可能爲 ToMV 而非 TMV。

植物感染 TMV 之病徵的表現受病毒系統 (strain)、環境因素及植物植齡等因素的影響頗大，早期 tobamoviruses 主要以指示植物的病徵作爲分類之依據 [27,44,48]，當時許多

12-2-7 2004/07/02 11:04 AM 頁面129

表一、洋桔梗病毒LV3 鞘蛋白基因與已發表ToMV 及TMV 序列之比較

Table 1. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein gene of LV-3 with those of other ToMV and TMV isolates available in GenBank.

Virus isolate	Accession No.	Source	Nucleotide identity (%)	Amino acid identity (%)
ToMV Queensland	AF332868	Australia	99.4	99.4
TMV OM	**X02144**		**99.2**	**99.4**
ToMV	AY063743		99.2	99.4
ToMV S1	AJ011934	China	99.2	98.8
ToMV potatol	AF260730	Korea	98.8	98.1
ToMV	AJ429083	Germany	98.8	98.8
ToMV DSMZ PV-472,	AJ429086	Germany	98.1	98.8
ToMV camellia	AJ417701	China	98.1	98.1
ToMV DSMZ PV-127	AJ429085	Germany	98.1	98.8
ToMV DSMZ PV-0135	AJ429084	Germany	97.3	97.5
ToMV	AF411922	Brazil	84.6	91.2
TMV	AF155507	China	99.2	99.4
TMV pepper	AF012917	Korea	99.2	98.1
TMV TOM	AF103779	South Korea	99.0	98.8
TMV TOB	AF103780	South Korea	98.8	99.4
TMV Potato2	AF318214	South Korea	98.8	98.1
TMV K3	AJ310339	Kazakhstan	97.7	96.9
TMV Kazakhstan	Z92909		97.7	96.2
TMV Kazakh K1	AF062519		97.3	96.2
TMV vulgare	**J02415**		**74.4**	**83.9**
TMV U1	**AX04017**		**74.4**	**83.9**
TMV	AF516913	China	72.7	82.5
TMV	AY029262		72.3	81.9
TMV	AF516911	China	72.3	83.1
TMV Fujian	AF395127	China	72.3	83.8
TMV	NC001367		71.9	83.1
TMV YN	AJ239099	China	71.9	83.1
TMV	AF273221	USA	71.9	83.1
TMV	AJ011933	China	71.9	83.1
TMV	AF165190	China	71.9	83.1
TMV faba bean	Z96945		71.9	83.1
TMV	AF516910	China	71.9	82.5
TMV Rakkyo	D63809		71.7	80.6
TMV	AF516912	China	71.5	83.1
TMV	V01406		71.2	83.1
TMV Potato3-4	AF318217	South Korea	71.0	83.1
TMV Potato3-2	AF318215	South Korea	71.0	83.8
TMV Potato3-1	AF318213	South Korea	70.8	83.1
TMV Potato 4	AF318218	South Korea	70.6	83.1
TMV Potato3-3	AF318216	South Korea	70.4	82.5
TMV	AF493053	China	70.2	81.9
TMV Tomato	AF126505	India	68.8	78.1
TMV korean tomato	L35074		62.9	74.1
TMV P	D13367	Japan	62.2	73.4
TMV korean pepper	L35073		61.8	69.8

12-2-7 2004/07/02 11:05 AM 頁面130

Tobamovirus 屬之病毒都被歸類爲TMV之系統，晚近由於各病毒系統之核酸序列陸續被解序完成，許多過去認爲是TMV的病毒系統，都已獨立爲種(species)[28,36,48]。其種之分類主要依據(1)不同病毒核酸鹽基序列相似度在90%以上者歸類爲系統，90%以下者成爲種，(2)不同病毒核鞘蛋白之血清類緣關係[28,48]，雖然如此目前TMV仍然包括許多系統(strains)[36,48]。此外從NCBI之GenBank中發現，目前已有多個的ToMV及TMV的鞘蛋白基因序列被登錄(表一)，經核酸及胺基酸序列分析發現它們的歧異度相當大。例如有些雖名爲TMV的分離株，但其鞘蛋白基因與TMV的代表株U1及vulgare僅有約70%的核酸及胺基酸相同度，另外有些TMV分離株的鞘蛋白基因序列與ToMV分離株的相同度高於TMV，反之亦然(data not shown)，因此GenBank上很多雖名爲ToMV或TMV者，仍須進一步分析方能確認其爲ToMV或TMV，或者可能爲其他的tobamoviruses，例如利用指示植物反應。已知ToMV感染某些特定之茄科植物時僅產生局部病斑，此和TMV對大部份茄科植物呈系統性感染差異顯著[15,24,28,34,50]。

早在1990年以色列即有報告指出tobamovirus可感染洋桔梗[23]，但從該報導無法區別該感染洋桔梗的tobamovirus是TMV或者是ToMV。此外Lisa及Grea[38]在"球根花卉病毒及類似病毒病害"一書提到ToMV可感染洋桔梗，但截至目前爲止並無正式的學術期刊報告，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及初步判定引起本省洋桔梗黃化斑駁、黃綠間雜嵌紋與矮化等病徵的LV-3爲一tobamovirus，此一研究報告爲台灣第一次報告*Tobamovirus*屬病毒可感染洋桔梗。

台灣種植之洋桔梗種苗多數由荷蘭、丹麥進口，部份則於台灣中部高冷地區自行育苗，由於田間感染tobamovirus之茄科作物不少，因此依目前結果我們尚無法判定LV3是隨進口種苗帶毒而來或者是在台灣栽種後受到感染，此有待進一步的研究及分析而判定。由於ToMV或TMV可經機械接種、植物間接觸及種子等方式傳播[28,48]，且病毒極耐高溫(90 ℃)，在汁液狀態可保存數年且其性質安定[28]，因此在洋桔梗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部份經費補助；於高屏地區田間調查時承高雄區農業改良場環境課邱明德課長及陳明昭先生協助；部份試驗工作承施淑晴小姐及黃婉玲小姐協助，特誌謝忱。

引用文獻

1. 成澤久. 1990. 高冷地洋桔梗. p.199-202. 切花栽培技術(一、二年生草花). 李叡明譯. 淑馨出版社. 台北. 316pp。
2. 金慧通. 1970. 58-59年期台中菸區菸草毒素病發生情形調查. p214-218. 菸葉試驗所59年年報。
3. 黃達雄. 1995. 洋桔梗. p.569-574. 台灣農業要覽農作篇(二). 豐年社. 台北. 698pp。
4. 陳慶忠、柯文華、曹淑麗、趙佳鴻 2001. 洋桔梗上蠶豆萎凋病毒之分離與鑑定. 台中區農業改良場研究彙報70:51-63。
5. 葉錫東. 1979. 台灣番茄毒素病病原之鑑定與純化. 國立中興大學植物病理研究所第九屆碩士論文48pp。
6. Balley, L. H. 1976. Hortus Third: a concise dictonary of plants cultivated in the United States and Canada. MacMillan, New York.
7. Chang, C. A., and Lin, H. H. 1990. Identification of a tobamovirus inducing foliar vein yellowing on passionfruit. Plant Protect. Bull. 32:330-331.
8. Chang, C. A., and Tsai, H. T. 1993. Isolation of *Bean yellow mosaic virus* from lisianthus developing foliar mosaic and flower breaking symptoms. Plant Pathol. Bull. 2:250-251.
9. Chao, C. H., Chen, C. C., Chang, C. A., and Chen, C. C. 2000. Identification of a *Turnip mosaic virus* isolate causing systemic yellow spotting on lisianthus. Plant Pathol. Bull. 9:115-122.
10. Chen, C. C., Chen, Y. K., and Hsu, H. T. 2000. Characterization of a virus infecting lisianthus. Plant Dis. 84:506-509.
11. Chen, C. C., and Hsu, H. T. 2002. Occurrence of a severe strain of *Lisianthus necrosis virus* in imported carnation seedlings in Taiwan. Plant Dis. 86:444.
12. Chen, C.C., and Hu, C. C. 1999. Purification and characterization of a cucumovirus from *Lisianthus rusellianus*. Plant Protect. Bull. 41:179-198.
13. Chen, C. C., Hu, C. C., Chen, Y. K., and Hsu, H. T. 2002. A fabavirus inducing ringspot disease in lisianthus. Acta. Hortic. 568:51-57.
14. Chen, C. C., Tsao, S. L., and Hsu, H. T. 2001. Diagnosis of *Lisianthus necrosis virus* infection by light and electron microscopy and serological assay. Plant Pathol. Bull. 10:105-114.
15. Christie, S. R. 1969. Nicotiana hybrid developed as a host for plant viruses. Plant Dis. Rept. 53:939.
16. Christie, S. R., Purcifull, D. E., Crawford, W. E., and Ahmed, N. A. 1987. Electron microscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small

12-2-7 2004/07/02 11:05 AM 頁面131

tissue samples with appendices on negative staining techniques. Fla. Agric. Exp. Stn. Bull. No. 872. 45pp.

17. Chu, F. H., Chao, C. H., Chung, M. H., Chen, C. C., and Yeh, S.-D. 2001. Completion of the genome sequence of *Watermelon silver mottle virus* and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. Phytopathology 91:361-368.
18. Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 48:311-317.
19. Cohen, J., Gera, A., Ecker, R., Ben, J. R., Perlsman, M., Gokkes, M., Lachman, O., and Antignus, Y. 1995. Lisianthus leaf curl a new disease of lisianthus caused by *Tomato yellow leaf curl virus*. Plant Dis. 79:416-420.
20. Cohen, J., Lapidot, M., Loebenstein, G., and Gera, A. 2001. First report of *Sweet potato sunken vein virus* occurring in lisianthus. Plant Dis. 85:679.
21. de Freitas, J. C., Kitajima, E. W., and Rezende, J. A. M. 1996. First report of *Tobacco streak virus* on lisianthus in Brazil. Plant Dis. 80:1080.
22. Dijkstra, J., and de Jager, C. P. 1998. Practical Plant Virology: Protocols and Exercises. p.277-284. Springer-Verlag Berlin; Heidelberg.
23. Gera, A. G., and Cohen, J. 1990. The natural occurrence of *Bean yellow mosaic*, *Cucumber mosaic and Tobacco mosaic viruses* in lisianthus in Israel. Plant Pathol. 39:61-564.
24. Gibbs, A. V. 1977. Tobamovirus group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No.184.
25. Goelet, P., Lomonossoff, G. P., Butler, P. J. G., Akam, M. E., Gait, M. J., and Karn, J. 1982. Nucleotide sequence of Tobacco mosaic virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5818-5822.
26. Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein blotting. p.165-178 in: Methods in Molecular Biology. Vol 1 Proteins. Walker, J. M. ed. Humana Press, Clifton, NJ.
27. Green, S. K., Hwang, J., and Wu, S. F. 1990. Isolation and characterization of four tobamoviruses on *Capsicum* spp. in Taiwan. Plant Protect. Bull. 32:332.
28. Hollings, M., and Huttinga, H. 1976. *Tomato mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No.156.
29. Iwaki, M., Hanada, K., Maria, E. R. A., and Onogi, S. 1987. *Lisianthus necrosis virus*, a new necrovirus from *Eustoma russellianum*. Phytopathology 77:867-870.
30. Iwaki, M., Maria, E. R. A., Hanada, K., Onogi, S., and Zenbayashi, R. 1985. Three viruses occurred in lisianthus plants. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 51:355.
31. 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.
32. Jan, F. J., and Yeh, S. D. 1995. Purification, in situ localization, and comparative serological properties of passionfruit woodiness virus-encoded amorphous inclusion protein and two other virus proteins. Phytopathology 85:64-71.
33. Koening, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55:53-62.
34. Komuro, Y., Iwaki, M., and Nakahara, M. 1966. Viruses isolated from tomato plants showing mosaic and/or streak in Japan, with special reference to tomato strain of tobacco mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 32:130-137.
35. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S., Cohen, J., Lampel, M., Zeidan, M., Raccah, B., and Gera, A. 2000. Lisianthus leaf necrosis: A new disease of lisianthus caused by *Iris yellow spot virus*. Plant Dis. 84:1185-1189.
36. Lewandowski, D., and Dawson, W. O. 1994. Tobamoviruses. p.1436-1441 in: Webster, R. G., and Granoff, A. ed. Encyclopedia of Virology, Vol. 3. Academic Press, San Diego.
37. Lisa, V., and Dellavalle, G. 1987. *Bean yellow mosaic virus* in *Lisianthus russellianus*. Plant Pathol. 36:214-215.
38. Lisa, V., and Gera, A. 1995. Lisianthus. p.443-448. 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.
39. Lisa, V., Vaira, A. M., d' Aquilio, M., Dellavalle, G., Masenga, V., Milne, R. G., and Bocardo, G. 1994. Characterization of an *Ilarvirus* from lisianthus (*Eustoma Grandiflorum*). Acta. Hortic. 377:81-89.
40. Lisa, V., Vaira, A. M., Milne, R. G., Luisoni, E., and Rapetti, S. 1990. *Tomato spotted wilt virus* in five crops in Liguria. Inform. Fitopatol. 40:34-41.
41. McGovern, R. J., Polston, J. E., and Harbaugh, B. K. 1997. Detection of a severe isolate of *Impatiens necrotic spot virus* infecting lisianthus in Florida. Plant Dis. 81:1334.
42. Napoli, C. C. L., 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.
43. Ohno, T., Aoyagi, M., Yamanashi, Y., Saito, H., Ikawa, S., Meshi, T., and Okada, Y. 1984. Nucleotide sequence of the Tobacco mosaic virus (Tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. J. Biochem. 96:1915-1923.
44. Oshima, N. 1979. Tomato viruses. In: Asian Vegetable Research and Development Center. Proceedings of the 1st

12-2-7 2004/07/02 11:05 AM 頁面132

international symposium on tropical tomato, Oct. 23-27, 1978 at Shanhua, Taunan, Republic of China. p.124-131.

45. Provvidenti, R. 1985. Two newly recognized hosts of *Cucumber mosaic virus: Eustoma grandiflorum* and *Peristrophe angustiofolia*. Plant Dis. 69:542.
46. Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3th ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
47. Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F., and Petersen, G. B. 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. J. Mol. Biol. 162:729-773.
48. Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., 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 Microbiologyical Societies. Academic Press.
49. Wolcan, S., Ronco, L., Bo, E. D., Lori, G., and Alippi, H. 1996. First report of diseases on lisianthus in Argentina. Plant Dis. 80:223.
50. Zaitlin, M., and Israel, H. W. 1975. *Tobacco mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 151.

ABSTRACT

Jan, F. J. [1], Zheng, Y. X. [1], Chao, C. H. [2], Ko, W. F. [2], Chang, C. C. [3], and Chen, C. C. [2,4]. 2003. Identification of a tobamovirus causing yellow mottle and stunting symptoms on lisianthus in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 12:122-132. ([1.] Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; [2.] Taichung District Agriculture Improvement Station, Tatsuan, Changhua, Taiwan; [3.] Department of Plant Plathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan; [4.] Corresponding author, E-mail: fjjan@nchu.edu.tw, Fax:+886-4-8521140)

A virus LV-3 was isolated from leaves of lisianthus (*Eustoma rusellianum*) showing viral disease-like symptoms of stunting, yellowing mottle and yellow spots in the fields of central Taiwan. Rigid rod particles similar to tobamoviruses about 300×18 nm in diameter were found in the crude saps of infected lisianthus leaves by electron microscope. Similar particles were also observed from the viruses purified from *Nicotiana tabacum* leaves infected with LV-3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of purified LV-3 virions showed that this virus contains one structural polypeptides, with around 18 kDa relative molecular weight, reacting positively to *Tomato mosaic virus* (ToMV) antiserum in Western assay. Serological tests with SDS-double diffusion tests and indirect ELISA showed that the lisianthus virus LV-3 is also positively reactive to antisera prepared to ToMV and *Tobacco mosaic virus* (TMV). The coat protein (CP) gene of LV-3 was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and then cloned and sequenced with primers designed from the conserve sequence of ToMV and TMV. Comparison of the 480 nucleotides CP gene region with those of ToMV available in GenBank revealed 84.6-99.4% nucleotide identity and 91.2-99.4% amino acid identity. Similar results (68.8-99.2% nucleotide identity and 78.1-99.4% amino acid identity) were obtained when GenBank TMV data were compared with the CP gene. Taken together, our results demonstrate that LV-3 isolated from lisianthus is a tobamovirus. Furthermore, this is the first report of lisianthus as a host of *Tobamovirus* in Taiwan.

Keywords: lisianthus, *Eustoma russellianum*, *Tobamovirus*