中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）40(3)：333～345（1991）

大蒜潛隱病毒在臺灣之發生及其生物特性[1]

鄧汀欽　蔡淑娓　蔡財旺[2]

摘要：從大陸進口的北蒜中分離出來的一個病毒單株，經鑑定是大蒜潛隱病毒（garlic latent virus, GLV）。其寄主範圍包括大蒜、洋蔥、葱、韭等葱科作物，但呈無病徵系統性感染，唯不感染韭葱；其他寄主反應包括：紅藜、*Chenopodium quinoa*、及番杏接種葉的局部病斑，豌豆的局部潛隱感染，黳豆的系統性壞疽等。但對供試的千日紅、孤挺花、百合、水仙、菸草（五種）、酸漿等皆不感染。經試驗 GLV 之耐熱性爲55-60°C，耐稀釋性爲10^{-3}—10^{-4}，耐保存性是3—4天。以 *C. quinoa* 接種葉的局部病斑爲材料進行病毒純化，經硫酸鉋等密度平衡離心，所得病毒試料之紫外光吸收光譜，最高值在 258 nm，最低值在 243 nm，其比值爲 1.084；260 nm 的吸收值與 280 nm 的吸收值之比是1.25。經電子顯微鏡觀察，GLV 的顆粒是較直的絲狀，長度大都在 600-700 nm 之間。以膠體電泳分析測定鞘蛋白之分子量，估計爲30.7K。由以上特性顯示 GLV 具有典型 carlavirus 的性狀。經注射白兎製備抗血清，結果以瓊脂擴散反應測定，抗 GLV 血清只與同源抗體反應，且力價達1/4。以間接法免疫酵素分析顯示 GLV 與日本 GLV-S（蕗蕷分離株）之反應一致，且與本省葱科分離株及韭分離株都有交叉反應；應用於田間大蒜植株檢定，抗體稀釋至1/1000仍有效。因此以夾層抗體法免疫酵素分析測定大蒜鱗莖帶 GLV 之情形，結果在1386個檢體中有413個呈陽性反應；至於田間大蒜株的病毒發生調查，採樣655株中，有146株葉片呈陽性反應，而 GLV 在臺灣的發生無地區性差異，唯在白葉或軟骨的大蒜品系有較高的發生率。

關鍵詞：葱科作物，大蒜潛隱病毒，寄主反應，抗血清，發生

大蒜屬葱科（Alliaceae）作物，是本省中南部沿海地區產值較高之蔬菜，也是荖桐、西螺及斗南一帶的冬季主要作物。因僅能以鱗莖繁殖，品種更新不易，加上臺灣氣候關係及專業區多年連作，病毒感染率極高[2,8,10]，有報告指出被害率達100%[4,6]，對大蒜之品質及產量影響極大[2,10]。近年又因種蒜供應不足，大量引進大陸蒜頭，使得大蒜病毒問題更形複雜。雖然早在1966年的農業要覽即已有大蒜毒素病的記載，但是臺灣的大蒜病毒之鑑定始自1975年周氏的報告[4]，目前已知的種類有洋葱黃萎病毒（onion yellow dwarf virus, OYDV）[4,27]、大蒜嵌紋病毒（garlic mosaic virus, GMV）[4,10,27]、菸草嵌紋病毒（tobacco mosaic virus, TMV）[10]、及未經命名的長絲狀病毒[6]；而在大陸北京地區，除上述病毒外，還有大蒜潛隱病毒（garlic latent virus, GLV）[5]。由於本省進行中的生長點培養[1,7]、無病毒種蒜繁殖[3]及抗毒素病品種篩選[8]都極需有關病毒發生之資料及檢定之方法，供健康種蒜檢疫及抗病檢定之用。日前在鑑定臺灣的大蒜病毒時，我們首次證實 GLV 的發生[9]，本研究特針對其生物性狀與大陸及國外之大蒜病毒作比較，並全面調查其發生情形，以建立資料供擬訂防

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1587 號。本試驗經費部份承農委會　78農建-7.1糧-35(17)及79農建-7.1糧-100(6)等計畫補助，鳳山分所林昭雄主任、曾紹均先生提供無病毒種蒜供試，臺南區農業改良場潘文祥主任、鄭安秀小姐協助病害調查，謹致謝忱。

2. 本所植物病理系助理研究員、約僱技術員、研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

治策略。

材料與方法

(一) 病毒來源

利用先前未經鑑定即行製備的複合大蒜病毒抗血清[30]篩檢大陸進口的北蒜蒜種，取呈陽性反應的蒜瓣播種後，以其成株葉片粗汁液接種 *Chenopodium quinoa* Willd.，在15-20°C環境下，3—4週後，於葉面形成局部病斑，利用此一特性，經三次單斑分離，得到一個病毒分離株（NG-1），將其接種到葱的實生苗上繁殖保存，進行以下試驗。

(二) 寄主範圍及反應試驗

供試植物包括洋葱（*Allium cepa* L.）、分葱（*A. cepa* var. *aggregatum* G. Don）、葱（*A. fistulosum* L.）、韭葱（*A. porrum* L. cv. American flag）、韭菜（*A. tuberosum* Rottl. ex K. Spreng.）、大蒜（*A. sativum* L.）、紅藜（*C. amaranticolor* Coste et Reyn.）、*C. quinoa*、千日紅（*Gomphrena globosa* L.）、孤挺花（*Hippeastrum hybridum* Hort.）、百合（*Lilium longiflorum* Thunb.）、水仙（*Narcissus tazetta* L.）、*Nicotiana benthamiana*、*N. debneyii* Domin.、*N. glutinosa* L.、*N. sylvestris* Speg et Comes、菸草（*N. tabacum* L. cv. White Burley）、酸漿（*Physalis floridana* Rydb.）、豌豆（*Pisum sativum* L.）、番杏（*Tetragonia expansa* J. Murr.）、及蠶豆（*Vicia faba* L.）等。

植株均種在防虫網室內，按一般病毒機械接種法，於苗期進行接種，以後逐日觀察病徵，記錄接種葉及新生葉之病徵，無病徵者採其葉片進行酵素聯結抗體免疫分析（ELISA）[28]，以確定是否爲無病徵感染（symptomless infection）。

(三) 病毒體外抗性之測定

"NG-1" 分離株接種於葱的實生苗，一個月後，經 ELISA 測定呈陽性反應者，取其葉片，以10倍量 phosphate buffer 淬取病毒粗汁液，進行病毒體外抗性之測定[32]：1. 利用55，60，65，70，75，80°C水浴處理10分鐘，冷卻後接種紅藜，測定其耐熱性（thermoinactivation point, TIP）。2. 經10^{-1}，10^{-2}，10^{-3}，10^{-4}，10^{-5}系列稀釋後接種紅藜，測定其耐稀釋性（dilution end point, DEP）。3. 病毒粗汁液分裝於小試管保存在24°C恆溫箱中，每日取出一管接種紅藜，測定其耐保存性（longevity in vitro, LIV）。

(四) 病毒純化

將 "NG-1" 分離株接種於*C. quinoa*，在15-20°C環境下繁殖2-3週，採集有局部病斑的葉片，冷凍（−60°C）過夜後，以含有 0.2% ascorbic acid、0.2% sodium sulphite、0.01 M sodium diethyl-dithiocarbamate、及0.2% nicotine 的0.01 M phosphate buffer（pH 7.0）淬取病毒粗汁液，以1/2量（w/v）chloroform 淨化後，經一次高低速交互離心取得部份純化材料，再經 cesium sulphate 等密度平衡離心法（isopycnic centrifugation）進一步純化[29]。所得純化材料以光譜儀（Hitachi 220S dual-beam spectrophotometer）測定紫外光吸收光譜，分析純化結果及病毒收量。

(五) 病毒鞘蛋白（coat protein）分子量之測定

取純化的病毒材料，以 sodium dodecyl sulfate (SDS) 處理後進行膠體電泳分析 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) [34]，以 Sigma SDS-6H kit 標示蛋白質分子量，決定鞘蛋白之相對分子量。

(六) 病毒形態電子顯微鏡觀察

取純化的病毒材料，經2% phosphotungstic acid 陰染，以電子顯微鏡 (Hitachi H7000) 觀察病毒形態，並量取長度。

(七) 抗血清製備與力價測定

純化的病毒材料以等量佐劑 (adjuvant) 完全混合並乳化後，用以注射白兎後腿肌肉，每週注射一次，五週後注射劑量共約爲4mg，即從耳靜脈部份採血，取其抗血清，每週採血一次，並利用 SDS-immunodiffusion[37]，在中央穴放置抗原，週圍各穴分別放置1，1/2，1/4，1/8，1/16，及1/32倍數稀釋的抗血清，測定其反應力價。

(八) 病毒血清類緣關係研究

1. 依前述 SDS-immunodiffusion 之方式，中央穴放置抗血清，供試之抗血清有本病毒抗血清及複合大蒜病毒抗血清，週圍各穴放置供試之抗原，包括本病毒外尚有未經鑑定之大蒜分離株 (GV-B 和 GV-T) 、韭菜分離株 (CL-1) 、鳳山選一號大蒜分離株 (F1) 、potato virus S (PVS) 、及健康韭菜和未接種的 *C. quinoa*之粗汁液，各加30μl，保存室溫下，觀察2—3天記錄沈澱帶之生成。
2. 以間接法 ELISA[38]比較病毒血清類緣關係，供試之抗體有本病毒抗血清、複合大蒜病毒抗血清、大蒜潛隱病毒蕗蕎分離株 (GLV-S) 抗血清 (日本大阪府立大學井上忠男提供) [18] ；抗原分別以 "NG-1" 、葱分離株 (WO-1) 、及 "CL-1" 等接種*C. quinoa*之葉片汁液經系列稀釋進行反應，比較 NG-1 與 GLV-S 血清類緣關係及其應用在田間大蒜病毒診斷之效率。
3. 以夾層抗體法 (double antibody sandwich, DAS) ELISA[28]，測定本病毒與 PVS (Boehringer Mannheim phytodiagnostic kit) 、potato virus X (PVX) 、tobacco mosaic virus (TMV) 、tomato mosaic virus (ToMV) 、cucumber mosaic virus (CMV) 、potato virus Y (PVY) 、CL-1 分離株及 F1 分離株等抗體之反應。

(九) 大蒜鱗莖帶病毒及田間發生情形調查

利用複合大蒜病毒抗血清及 "NG-1" 大蒜潛隱病毒抗血清，配製成檢驗試劑，經 DAS-ELISA 篩檢市售大蒜鱗莖，以完整的蒜球爲一單位，取其中之一蒜瓣爲材料，進行病毒檢定，並至栽培區採集田間各品種大蒜植株，以葉片爲分析材料，調查發病情形。

結　果

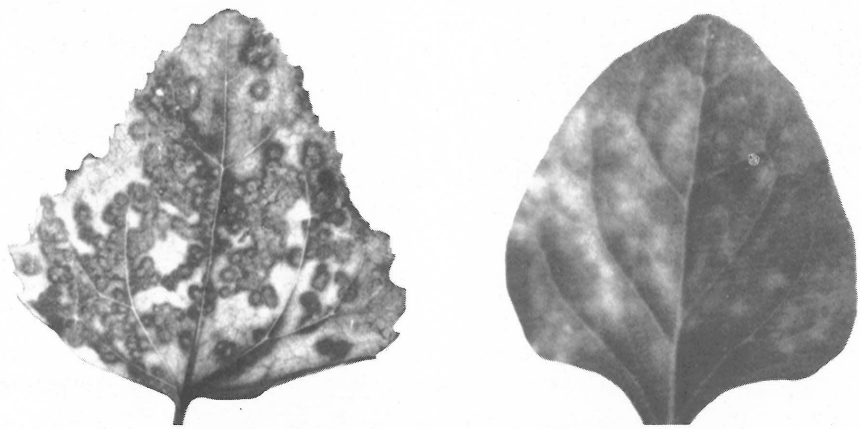
(一) 寄主範圍及反應

在氣溫15-20°C的環境下，接種三週後的寄主反應如表一所示，葱科的供試植物除韭葱 (*A. porrum*) 外，皆呈系統性感染，但無明顯病徵；紅藜、*C. quinoa*、及番杏在接種葉呈現局部黃斑 (如圖一所示) ；豌豆只在接種葉呈無病徵感染，蠶豆則在接種葉及上位葉呈部份的系統性壞疽；此外，其餘供試植物皆不受感染。

表一 大蒜潛隱病毒（北蒜分離株 NG-1）寄主範圍試驗之結果
Table 1 Host reactions of NG-1 isolate of garlic latent virus

供試植物 (Test plant)	Symptoms	
	inoculated leaves	systemic
洋蔥 (*Allium cepa*)	latent	latent
分蔥 (*A. cepa* var. *aggregatum*)	latent	latent
蔥 (*A. fistulosum*)	latent	latent
韭蔥 (*A. porrum*)	—	—
韭菜 (*A. tuberosum*)	latent	latent
大蒜 (*A. sativum*)	latent	latent
紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)	chlorotic lesions	—
奎藜 (*C. quinoa*)	chlorotic lesions	—
千日紅 (*Gomphrena globosa*)	—	—
孤挺花 (*Hippeastrum hybridum*)	—	—
百合 (*Lilium longiflorum*)	—	—
水仙 (*Narcissus tazetta*)	—	—
菸草 (*Nicotiana benthamiana*)	—	—
N. debneyii	—	—
N. glutinosa	—	—
N. sylvestris	—	—
N. tabacum L. cv. White Burley	—	—
酸漿 (*Physalis floridana*)	—	—
豌豆 (*Pisum sativum*)	latent	—
番杏 (*Tetragonia expansa*)	chlorotic lesions	—
蠶豆 (*Vicia faba*)	necrotic spots	necrotic spots

[1]— : symptomless and no virus was detected by ELISA.



圖一 大蒜潛隱病毒接種紅藜（左）及番杏（右）所引起之局部病斑。
Fig. 1 Local lesions on *Chenopodium amaranticolor* (left) and *Tetragonia expansa* (right) induced by inoculation with garlic latent virus.

（二）病毒體外抗性

經測定 "NG-1" 分離株之各項特性如下：

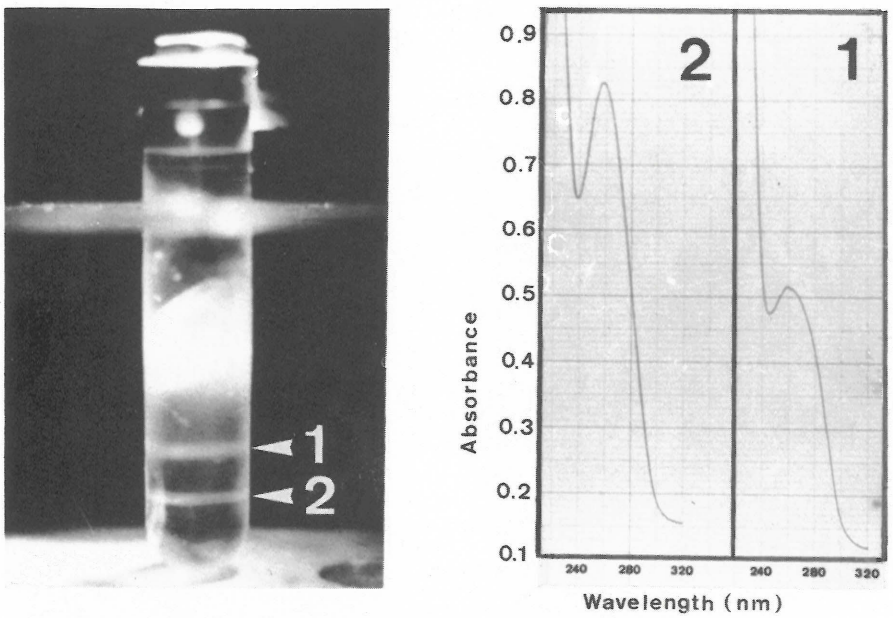
1. 耐熱性（TIP）爲55—60°C
2. 耐稀釋性（DEP）爲10^{-3}—10^{-4}
3. 耐保存性（LIV）爲3—4days。

（三）病毒純化及顆粒特性

硫酸銫等密度平衡離心23小時後，在離心管中離液面46㎜及54㎜處各有一蛋白光帶（如圖二所示），分別抽取出來，經充分透析，測定其 220-320 nm 的紫外光吸收光譜，結果如圖二所示，僅有上層帶呈現典型的核蛋白吸收曲線，最高值（Amax）在 258 nm，最低值（Amin）在 243 nm，未經散光效應（light scattering）校正，估計 Amax/Amin＝1.084，A260/A280＝1.25；若吸收係數（absorption coefficient）訂爲2.8[33]，則估計每克 *C. quiona* 的接種葉可以純化出 24.87μg 的病毒。這些試料經以電子顯微鏡觀察，如圖三所顯示的病毒顆粒，其形態較爲硬直而呈絲狀，長度大多在 600-700 nm 之間。經 SDS-PAGE 測定病毒鞘蛋白之分子量，如圖三所示，其 monomer 之分子量約爲30.7K。

（四）抗血清製備與反應力價

經 SDS-immunodiffusion 之結果，"NG-1" 分離株和大蒜病株都一致與複合大蒜病毒抗血清形成沈澱帶（圖四左），但 "NG-1" 抗血清只與同源（homologous）之抗原起反應（圖四中），而不與其他異源（heterologous）抗原及健康對照起反應，另以同法測定其反應力價，在抗血清稀釋至1/4倍時，仍有沈澱帶生成（圖四右）。



圖二　硫酸銫等密度平衡離心法純化大蒜潛隱病毒之結果。

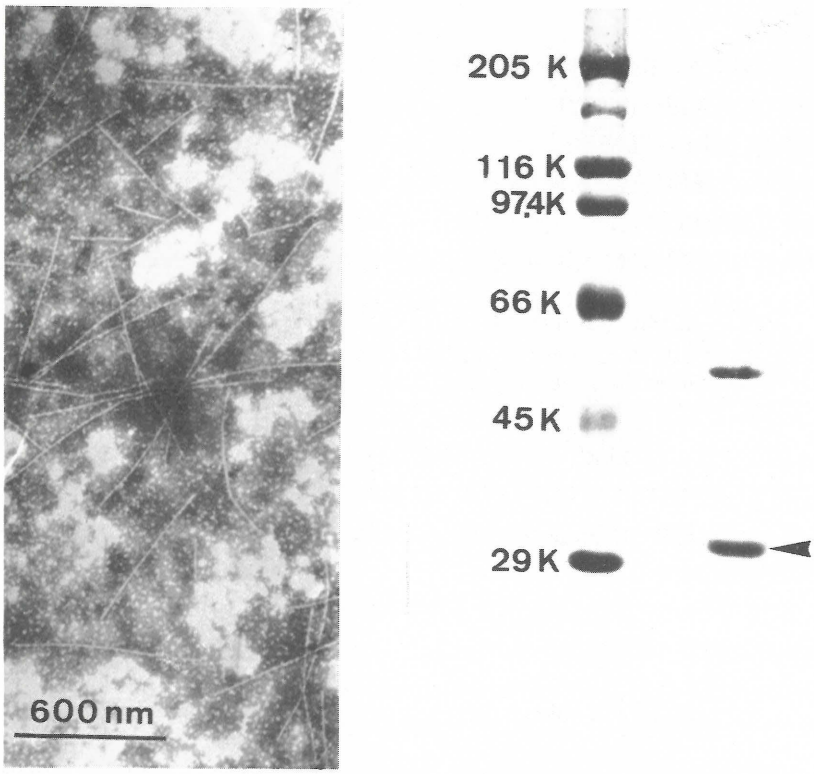
Fig. 2 Results of garlic latent virus purified by cesium sulfate isopycnic centrifugation.

左：離心管中液面下46mm（標示1）及 54mm（標示2）處各有一蛋白光帶。

Left：Two opalescent bands (1 and 2) were located 46 mm and 54mm below the meniscus.

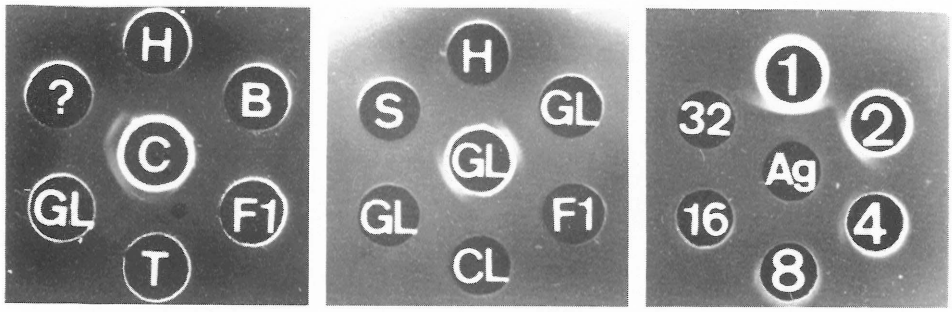
右：1及2蛋白光帶之紫外光吸收光譜。

Right：Ultraviolet absorption spectra of bands 1 and 2.



圖三 大蒜潛隱病毒純化材料之電子顯微鏡相（左）及電泳分析之鞘蛋白分子量（右）。

Fig. 3 Electron micrography of garlic latent virus from purified preparation (left) and molecular weight of its capsid protein analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (right). Standard protein markers are carbonic anhydrase (29K), egg albumin (45K), bovine albumin (66K), phosphorylase b (97.4K), β-galactosidase (116K), and myosin (205K). Molecular weight of capsid protein monomer (arrow indicated) was estimated 30. 7K.



圖四 SDS-immunodiffusion 之結果。

Fig. 4 Results of SDS-immunodiffusion tests.

左：複合大蒜病毒抗血清(C)置於中央穴，週圍各穴分別放置健康韭菜(H)、未經鑑定之大蒜分離株(B和T)、鳳山選一號大蒜分離株(F1)、大蒜潛隱病毒(GL)、及田間大蒜病株(?)之粗汁液。

Left：Antiserum to complex garlic viruses was loaded in central well and peripheral wells were loaded with crude saps of healthy Chinese leek (H), unidentified virus of garlic isolate (B, F1, and T), garlic latent virus (GL), and field garlic plant (?).

中：大蒜潛隱病毒抗血清(GL)置於中央穴，週圍各穴分別放置健康 *C. quinoa* (H)、大蒜潛隱病毒(GL)、鳳山選一號大蒜分離株(F1)、韭菜分離株(CL)、及馬鈴薯 S 病毒 (S) 之粗汁液。

Medium：Antiserum to garlic latent virus was loaded in central well and peripheral wells were loaded with crude saps of healthy *C. quinoa* (H), garlic latent virus(GL), F1 garlic isolate(F1) , Chinese leek isolate(CL), and potato virus S(S).

右：大蒜潛隱病毒抗原之粗汁液(Ag)置於中央穴，週圍各穴分別爲其二倍系列稀釋的抗血清，圖中數字即爲其稀釋倍數。

Right：Antigen of garlic latent virus (Ag) was loaded in central well and homologous antiserum with serial dilutions were loaded in peripheral wells (numbers are dilution folds).

(五) 血清類緣

以間接法 ELISA 比較血清類緣，如表二所示，"NG-1" 分離株病毒除與同源抗體正反應外，與複合大蒜病毒抗血清及 GLV-S 抗血清都有明顯的反應，且 "NG-1" 抗體與 "WO-1" 之反應較弱，結果和 GLV-S 一致。此外，在抗原稀釋至1/1000時，仍可檢出病毒，而不與健康對照起任何反應，可顯現其用於病毒檢定的效率。進而應用 DAS-ELISA 以測定 "NG-1" 分離株與 PVS、PVX、TMV、ToMV、CMV、PVY 等抗體之反應，則都呈負反應。綜合以上各項性狀，認爲本試驗之 "NG-1" 分離株即是大蒜潛隱病毒 (GLV) 。

表二 ELISA 比較 NG-1 與 GLV-S 血清類緣關係及其在大蒜病毒診斷之效率

Table 2 ELISA results to compare serological relationship between "NG-1" and GLV-S and its efficiency in garlic virus indexing[1)]

Virus isolate	Original host	Propagation host	Sap dilution	Antibodies (IgG)		
				CGV[2)]	NG-1[3)]	GLV-S[4)]
NG-1	北蒜 (Northern garlic)	*C. quinoa*	1/10	1.090	1.208	1.554
			1/100	0.587	0.812	0.745
			1/1000	0.533	0.672	0.537
WO-1	葱 (Welsh onion)	*C. quinoa*	1/10	1.164	1.294	1.332
			1/100	0.670	0.780	0.793
			1/1000	0.524	0.579	0.566
CL-1	韭 (Chinese leek)	*C. quinoa*	1/10	0.355	0.209	0.347
			1/100	0.197	0.182	0.224
			1/1000	0.315	0.177	0.161
Healthy CK		*C. quinoa*	1/10	0.037	0.002	0.073
Field sample	大蒜 (garlic)	*A. sativum*	1/10	1.071	0.580	0.946
			1/100	0.982	0.528	0.560
			1/1000	0.858	0.435	0.444
Healthy CK	大蒜 (garlic)	*A. sativum*	1/10	0.065	0.001	0.042

1) 間接法 (indirect method) 進行 ELISA[38]
2) CGV：未經鑑定即行製備的複合大蒜病毒抗血清
Antiserum to unidentified complex garlic virueses[30]
3) NG-1：本試驗之 NG-1 分離株大蒜潛隱病毒抗血清
Antiserum to garlic latent virus "NG-1" isolate in this experiment
4) GLV-S：大蒜潛隱病毒蔕蕎分離株抗血清 (日本大阪府立大學井上忠男提供)
Antiserum to garlic latent virus scallion isolate contributed by T. Inouye (University of Osaka, Japan) [18]

(六) 大蒜鱗莖帶病毒及田間發生情形

利用 DAS-ELISA 測定大蒜鱗莖帶病毒之情形，結果如表三所示，總共1386個檢體中，有980個與複合大蒜病毒抗體呈陽性反應，413個與 GLV 抗體呈陽性反應（其中98個是由 GLV-S 測定）。至於田間大蒜植株的病毒發生調查，結果如表四所示，總共採樣655個，有386個與複合大蒜病毒抗體呈陽性反應，146個與 GLV 抗體呈陽性反應。

表三 利用 ELISA 測定大蒜鱗莖帶大蒜潛隱病毒之情形

Table 3 Detection of garlic latent virus in garlic bulbs by ELISA[1)]

種蒜來源 (Bulb source)	品種 (Variety)	與抗體正反應的檢體數 No. of samples reacted with CGV[2)]	GLV-S[3)]	GLV[4)]	總數 Total
日本採購 (Market in Japan)	(unknown)	13	0		31
臺南採購 (Market in Tainan)	花蒜 (Fashuan)	12	17		50
第二代自留種 (2′ generation)		46	61		83
第三代自留種 (3′ generation)		177		91	177
臺中採購 (Market in Taichung)	蒲蒜 (Pushuan)	112	5		269
第二代自留種 (2′ generation)		235		120	244
無病毒種蒜 (Virus free garlic)	鳳選一號 (F1)	0	11		26
第二代自留種 (2′ generation)		46		12	79
無病毒種蒜 (Virus free garlic)	鳳選二號 (A2)	0	4		29
第二代自留種 (2′ generation)		55		18	89
大陸進口 (Mainland China)	北蒜 (Peishuan)	81			81
第二代自留種 (2′ generation)		131		55	131
大陸進口 (Mainland China)	新疆 (Shinchiang)	23		14	23
義竹採購 (Market in Yuchu)	蒲蒜 (Pushuan)	29		3	40
達邦田間 (Field in Tapang)	鳳選一號 (F1)	2		0	3
達邦田間 (Field in Tapang)	鳳選二號 (A2)	0		0	3
達邦田間 (Field in Tapang)	CITC10	3		0	3
達邦田間 (Field in Tapang)	CITC11	3		0	3
達邦田間 (Field in Tapang)	CITC12	1		1	3
北門田間 (Field in Peimen)	蒲蒜 (Pushuan)	5		1	5
學甲田間 (Field in Hsuehchia)	大片黑 (Tapenhei)	2		0	4
臺南田間 (Field in Tainan)	花蒜 (Fashuan)	4		0	10
總計 (Total)		980	98	315	1386

1) 以夾層抗體法 (DAS) 進行 ELISA[28]

2) CGV：未經鑑定即行製備的複合大蒜病毒抗血清
Antiserum to unidentified complex garlic virueses[30]

3) GLV-S：大蒜潛隱病毒蕗蕎分離株抗血清（日本大阪府立大學井上忠男提供）
Antiserum to garlic latent virus scallion isolate contributed by T. Inouye (University of Osaka, Japan) [18]

4) GLV：本試驗之 NG-1 分離株大蒜潛隱病毒抗血清
Antiserum to garlic latent virus "NG-1" isolate in this experiment

表四 利用 ELISA 調查大蒜潛隱病毒在臺灣大蒜植株之發生

Table 4 Occurrence of garlic latent virus on Taiwan garlic plants detected by ELISA[1)]

採集地點 (Location)	品 種 (variety)	與抗體正反應的株數 No. of plants reacted with antibody of CGV[2)]	GLV[3)]	總 數 Total
霧峰 Wufeng	鳳選一號 (F1)	31	6	62
(農試所 TARI)	鳳選二號 (A2)	22	8	57
	北蒜 (Peishuan)	42	16	43
西螺 Hsilo	大片黑 (Tapenhei)	1	0	16
崙背 Lunpei	大片黑 (Tapenhei)	10	2	21
麥寮 Myliao	大片黑 (Tapenhei)	18	17	40
	北蒜 (Peishuan)	21	21	21
虎尾 Huwei	大片黑 (Tapenhei)	5	3	21
土庫 Tuku	大片黑 (Tapenhei)	2	0	22
元長 Yuanchang	大片黑 (Tapenhei)	1	1	30
北港 Peikang	蒲蒜 (Pushuan)	6	0	12
四湖 Shihfu	蒲蒜 (Pushuan)	8	1	12
	大片黑 (Tapenhei)	23	0	30
義竹 Yuchu	鳳選一號 (F1)	17	6	22
(臺南農改場 Tainan DAIS)	鳳選二號 (A2)	9	0	21
	A10-2	16	10	20
	116	20	13	21
	花蒜 (Fashuan)	41	20	42
	北蒜 (Peishuan)	19	4	20
	蒲蒜 (Pushuan)	19	7	22
	大片黑 (Tapenhei)	10	2	20
安定 Anding	大片黑 (Tapenhei)	11	4	40
	花蒜 (Fashuan)	14	1	20
臺南 Tainan	花蒜 (Fashuan)	20	4	20
總數 (Total)		386	146	655

1) 以夾層抗體法 (DAS) 進行 ELISA[28]

2) CGV：未經鑑定即行製備的複合大蒜病毒抗血清
Antiserum to unidentified complex garlic virueses[30]

3) GLV：本試驗之 NG-1 分離株大蒜潛隱病毒抗血清
Antiserum to garlic latent virus "NG-1" isolate in this experiment

討 論

1946年 Brierley 和 Smith[25]首次從大蒜嵌紋病的樣本中分離出大蒜病毒，其中一個樣本即來自中國蘭州，當時雖然對病毒的性狀不很瞭解，他們仍認爲這些大蒜病毒即是 OYDV 的一個弱系 (mild strain)。1960年代法國的研究報告把罹患嵌紋病的大蒜中所分離出來的病毒命名爲 garlic mosaic virus (GMV)，而由病毒顆粒長度 (500-600 nm)，顯示其爲一種carlavirus[24,33]。隨後在世界各地都有大蒜嵌紋病的發生報告，一至兩種 potyviruses 也被認爲是病原[4,6,10,12,14,16,24,26,27,35,36]。1979年李氏等從日本大蒜中分離出來的兩種病毒，其中的 carlavirus 回接大蒜植株，僅造成無病徵系統性感染，因此將其命名爲 garlic latent virus，而把另一 potyvirus 命名爲 garlic mosaic virus

，因其回接大蒜才造成嵌紋病徵[16]。雖然這一分類命名系統未被 CMI/AAB 接受[24]，但是 Bos 承認 GLV 雖與 shallot latent virus (SLV) 有許多類似的特性，但兩者並不完全相同，尤其是血清關係[23,24]，Pena-Iglesias 亦認爲西班牙大蒜上所發生的 carlavirus 即是 GLV[36]，因此1989年周氏等在北京近郊所分離出來的 GLV，就是以大蒜潛隱病毒的中文命名[5]，本文沿用之。

試驗中的 "NG-1" 分離株之寄主反應，大都與前人報告[5,13,16]GLV 的反應相同，其寄主範圍不包括千日紅，而能感染豌豆及蠶豆，並在紅藜、*C. quinoa* 及番杏上造成局部病斑，這些特性即能與 GMV 明顯鑑別；再觀察其病毒顆粒 (長600-700 nm) 更可證實其屬於 carlavirus ，而異於 GMV 的 potyvirus 之屬性。另外 GLV 與 SLV 的不同點在體外抗性的比較，SLV 的 TIP 可達80°C，DEP 爲10^{-4}—10^{-5}，LIV 爲8-11天[23]，皆遠非 GLV 所能達；而且 SLV 接種紅藜或*C. quinoa*只要6-10天即可出現病斑，本試驗之 GLV 在15-20°C環境下要14-21天才出現病徵，而溫度高過30°C時即未能感染。

關於 GLV 的純化，以往都是以蠶豆當繁殖寄主[5,16,18]或直接由青葱的病株[31]來純化，但是本試驗的病毒分離株接種在供試的蠶豆品種上，其系統性的病徵發展受到抑制，較後期的新葉並未有病毒蔓延上去，因此改採以*C. quinoa*接種葉當純化材料，雖然病毒只存在病斑內，但是以電子顯微鏡觀察病斑的粗汁液，可看到相當濃度的病毒顆粒，最後純化的結果，亦證實回收的病毒量相當高 (24.87μg/g) ，但除了上述因素外，本試驗係以硫酸銫平衡離心法來純化病毒亦有關。至於 GLV 的紫外光吸收光譜，在日本的報告是 Amax＝260nm，Amin＝245nm，A260/A280＝1.37，Amax/Amin＝1.10[16]，或A260/A280＝1.34，Amax/Amin＝1.23[18]，雖然本試驗 GLV 之結果與之不盡相同，但其數據都在 calavirus的範圍內[33]。而病毒鞘蛋白分子量估計爲30.7K，並無前人的數據可以比較，唯 SLV 的鞘蛋白分子量報告爲23K[23]，而一般 carlavirus 的分子量是31-34K[33]。

血清試驗中 SDS-immunodiffusion 之結果，複合大蒜病毒抗血清可與 GLV 正反應，而GLV 僅與同源抗血清反應，但是以 ELISA 測定血清類緣時，葱 (WO-1) 及韭 (CL-1) 分離株都是 GLV 抗體陽性反應，可見其間有交叉反應力 (cross reactivity) 只是在 SDS-immunodiffusion 時偵測不出來；至於 "NG-1" 分離株與 GLV-S 呈相同的血清反應，證實他們血清關係的密切；再利用複合大蒜病毒抗血清及 GLV 抗血清同時進行 ELISA 以篩檢大蒜標本時，有許多 GLV 抗體陰性反應的標本與複合大蒜病毒抗血清呈陽性反應，因此推斷還有一種或以上的病毒 (GMV 或其他) 存在於本省大蒜上，唯根據本試驗調查之結果，大蒜鱗莖有約30%的 GLV 檢出率，田間植株有約22%的 GLV 發生率；而其發生在全省地區性分佈很均勻，完全視栽培品種而定，如花蒜、北蒜等白葉品系上 GLV 發生率偏高，但黑葉或硬骨品系如大片黑及鳳選二號較少發生，蒲蒜則介於其間；調查中也發現大陸進口的蒜頭有較高的帶病毒率，試驗田自留種的後代帶病毒比率也累積升高。雖然GLV單獨感染對大蒜不造成病徵，在產量上影響也不大，但是若與 GMV 混合感染，即使發病程度加重，減產可至正常量的1/4[22]。甚至葱、韭、藠薹等作物上都有 GLV 的發生，其所受的影響則和大蒜的情形相似[13,17,19,20,21]，因此 GLV 所造成的經濟損失，應不可忽視。利用大蒜生長點培養以脫除其中的病毒，國內外皆有成功的例子[1,5,7,11,36]但是在大量繁殖的過程中，如何避免病毒再汚染，是健康種蒜量產的關鍵，尤其 GLV 以潛隱的狀態存在，一旦感染也不易察覺而在其間廣爲蔓延。因此本試驗製備的抗血清及研擬的鑑定診斷技術都可提供作爲無病毒 (virus-free) 種蒜檢疫的依據，爲本省健康種蒜繁殖體系的建立略盡棉薄之力。

參考文獻

1. 王博仁、黃麗春。1974。大蒜莖頂生長點培養。中國園藝 20：79—87。

2. 林俊義。1984。大蒜嵌紋病對大蒜產量與品質之研究。中國園藝 30：165-172。

3. 林昭雄、曾紹均。1988。大蒜無病毒種蒜繁殖。蔬菜作物試驗研究彙報 5：188-192。
4. 周延光。1975。臺灣石蒜科作物病毒之研究。臺灣農業 11(4)：119-137。
5. 周桂珍、曹鳴慶、裘季燕、孫東玲。1989。京郊大蒜病毒病的研究及其鱗莖中病毒的脫除。植物病理學報 19：145-149。
6. 翁榮南、韓又新。1978。大蒜嵌紋病毒之研究。植保學會76年年會論文摘要：3。
7. 楊秀吉。1974。大蒜的莖頂生長點及組織培養。中國園藝 20：213-218。
8. 曾紹均。1988。大蒜抗（耐）毒素病品種之篩選。蔬菜品種改良研討會：331-337。
9. 鄧汀欽、蔡淑娓、蔡財旺。1990。大蒜潛隱病毒之分離與鑑定。植保會刊 32：330（摘要）。
10. 蘇鴻基、陳永戊、劉慧卿。1976。大蒜嵌紋病之病原研究。植保會刊 18：397（摘要）。
11. 小川勉、松原德行、森憲昭。1976。ニンニクのウイルスフリー株育成。農業および園藝 51：551-554。
12. 久保美佳、長久保有之、大川秀郎。1990。ニンニクホワイト6片種に感染するウイルスの抗血清による檢定。日植病報 56：426（摘要）
13. 中曾根渡、岡田清嗣、草刈眞一。1988。ネギの黃化萎縮株かう分離されたひも狀ウイルスについて。日植病報 54：108-109（摘要）。
14. 佐古宣道。1976。ニンニクのウイルス病（予報）その發生とウイルス樣粒子の檢出。日植病報 42：101（摘要）。
15. 佐古宣道、長尾記明。1977。ニンニクのウイルス病（第2報）ニンニクモザイク病葉の微細構造。日植病報 43：114（摘要）。
16. 李龍雨、山崎昇三、尾崎武司、井上忠男。1979。ニンニクに見出される2種のひも狀ウイルス，ニンニク潛在ウイルス（garlic latent virus）ならびにニンニクモザイクウイルス（garlic mosaic virus）。日植病報 45：727-734。
17. 佐古勇、尾崎武司、井上忠男、中曾根渡。1988。DIBA 法による各種ネギ屬植物の GLV（garlic latent virus）の檢出および發生狀況。日植病報 54：109（摘要）。
18. 佐古勇、福本明彥、中曾根渡、岡田清嗣、尾崎武司、井上忠男。1988。抗garlic latent virus ラッキヨウ分離株（GLV-S）血清の作製と血清學的診斷法によるウイルスフリ-檢定。日植病報 54：402（摘要）。
19. 佐古勇、谷口達雄、尾崎武司、井上忠男。1989。Garlic latent virus（GLV）の傳染方法とラッキヨウにおける再傳染について。日植病報 55：537（摘要）。
20. 佐古勇。1990。ネギにおける GLV（garlic latent virus）と OYDV（onion yellow dwarf virus）の發生實態。日植病報 56：128（摘要）。
21. 長田龍太郎、佐古宣道。1989。ラッキョウに感染するニンニク潛在ウイルス（GLV）とタバコモザイクウイルス（TMV）。日植病報 55：537（摘要）。
22. 藤澤一郎。1987。ニンニクのウイルス病と被害。今月の農業 31期11月號 68-70。
23. Bos, L. 1982. Shallot latent virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 250.
24. Bos, L. 1983. Viruses and virus diseases of *Allium* species. Acta Horticulturae No.127:11-29.
25. Brierley, P., and Smith, F. F. 1946. Reaction of onion varieties to yellow-dwarf virus and to three similar viruses isolated from shallot, garlic, and narcissus. Phytopathology 36:292-296.
26. Cadilhac, B., Quiot, J. B., Marron, J., and Leroux, J. P. 1976. Electron microscopic studies of two different kind of virus particles in diseased garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. cepa* L. var.*ascalonicum*). Ann. Phytopathol. 8:65-72.
27. Chen, M. J., and Ko, N. J. 1979. Etiological studies on virus diseases of garlic in Taiwan. Plant Prot. Bull (Taiwan) 21:220-225.
28. 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. 34:475-483.
29. Deng, T. C. and Huang, C. H. 1986. Purification and antiserum preparation of maize dwarf mosaic virus. J. Agric. Res. China 35:350-359.

30. Deng, T. C., and Tsai, T. W. 1988. Preparation of an antiserum against a virus associating with garlic and its efficiency in garlic virus indexing. Plant Prot. Bull (Taiwan) 30:421. (Abstr.)
31. Fukamil, M., Natsuaki, K. T., Motoyoshi, F., and Tomaru, K. 1989. Simple and rapid detection of garlic latent virus from Welsh onions by gelatin particle agglutination test. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55:671-675.
32. Hill, S. A. 1984. Basic virus characterization and storage. Methods in Plant Virology 1:18-24.
33. Koenig, R. 1982. Carlavirus group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 259
34. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
35. Lastra, R., Ladera, P., and Debrot, E. A. 1979. Purification of garlic mosaic virus. Phytopathology 69 : 1036. (abstr.)
36. Pena-Iglesias, A., and Ayuso, P. 1982. Characterization of Spanish garlic viruses and their elimination by in vitro shoot apex culture. Acta Horticulturae 127:183-193.
37. Purcifull D. E., and Batchelor D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) -treated plant viruses and plant viral inclusions. Agric. Expt. Sta., Univ. Fla. Bulletin 788, 39p.
38. Voller, A., Bidwell, D. E., and Bartlett, A. 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice. Bull. World Health Organ.53:55-65.

Occurrence of garlic latent virus in Taiwan and its biological characterization[1]

T. C. Deng, S. W. Tsai and T. W. Tsai[2]

Summary

Garlic latent virus (GLV) was isolated from plants of "northern garlic", which seed-bulbs were imported from mainland China in 1989. It caused symptomless infection on garlic, onion, shallot, Welsh onion, Chinese leek, and pea, local lesions on *Chenopodium amaranticolor, C. quinoa,* and *Tetragonia expansa*, or systemic necrosis on broad bean, but did not infect leek, narcissus, lily, belldonna lily, tobacco (5 species) , *Gomphrena globosa*, and *Physalis floridana* in host range test. The virus was propagated in Chinese leek and assayed in *C. amaranticolor*; thermal inactivation point (TIP) is 55-60°C, dilution end point (DEP) is 10^{-3}-10^{-4}, and longevity in vitro is 3-4 days. Purified preparation was obtained from GLV inoculated leaves of *C. quinoa* by cesium sulfate isopycnic centrifugation. The ultraviolet absorption spectrum of GLV is typical of a nucleoprotein, with maximum at 258 nm, minium at 243 nm, Amax/Amin ratio is 1.084, and A260/A280 ratio is 1.25. For the most part of GLV particles in purified preparation are slightly straight filaments with length of 600-700 nm. Molecular weight of capsid protein monomer estimated by SDS-PAGE is 30,700 daltons. Antiserum against GLV was prepared by injecting purified virion to a rabbit. In SDS-immunodiffusion tests, the antiserum reacted only with homologous antigen and its titer was 1/4. Indirect ELISA showed that GLV was serologically identical to GLV-S (a Japanese scallion isolate) and cross-reacted with a Welsh onion isolate or a Chinese leek isolate. For virus indexing in garlic, a 1/1000 dilution of leaf sap was positively detected by ELISA. Consequently, a survey for GLV occurrence by DAS-ELISA was conducted in 1988-1991. A total of 1,386 garlic bulbs purchased from markets or collected from fields, 413 samples were reacted with antibody against GLV; and GLV was also detected in 146 leaf samples out of 655 plants collected from garlic fields. It was indifferent in the frequence of virus distribution on garlic growing areas of Taiwan but GLV was prevalent on white leaf varieties of garlic.

Key words : *Allium*, garlic latent virus, GLV, carlavirus, host, antiserum, occurrence

1. Contribution No. 1587 from Taiwan Agricultural Research Institute. This research was supported in part by grants from Council of Agriculture, Executive Yuan, R.O.C. We are grateful to C. H. Lin and C. C. Tseng in Fengshan Tropical Horticultural Experiment Station for offering virus-free garlic bulbs. We also thank A. H. Cheng and W. S. Pan in Tainan District Agricultural Improvement Station for helping diseased garlic collection in the field.

2. Assistant Plant Pathologist, Technician of projects, and Senior Specialist respectively. Department of Plant Pathology, TARI, Wufeng, 413, Taichung, Taiwan, R.O.C.