臺灣葡萄汁液傳播性病毒病之發生

The Occurrence of Sap-transmissible Virus Diseases of Grapevine in Taiwan

楊 一 郎　鄧 汀 欽[1]

I-lang Yang and Ting-chin Deng

關鍵字：汁液傳播性，黃斑病，病毒

Key words: Sap-transmissible, yellow mottle, virus, TmRSV, GFLV, GBLV, GCMV.

摘　要：經5年採集並利用汁液接種草本檢定植物，檢定本省葡萄呈現黃斑型病徵之病害標本，並經單斑分離得到5個病毒分離株；其中2個病毒分離株與TmRSV抗血清有正反應，且利用電子顯微鏡觀察病株粗汁液與組織切片時，均發現直徑26～30mm之球型病毒，顯示此分離株爲TmRSV之系統。以G614病毒分離株接種在 *Nicotiana benthamiana* 植株上，進行純化，並製得 G614 病毒抗血清。

利用ELISA測定自田間採集的430株疑似病毒病株，發現有4%的病株與G614抗血清反應，10.7%的病株與 TmRSV 抗血清反應，17.4%的病株與GFLV抗血清反應，8.4%的病株與GBLV抗血清反應。另自中部葡萄田逢機調查的1742株樣品中，發現有13.8%的樣品呈現可疑黃斑病毒病徵，經ELISA測定結果僅有1.3%（22株）與G614抗血清反應。又以 TmRSV及GFLV抗血清檢定本所葡萄種源庫內呈現疑似黃斑病毒病徵的69個葡萄品系中，發現S1207、S1076、S1191等3個品系與TmRSV抗血清反應，然對GFLV抗血清並無反應。

前　言

葡萄病毒病害普遍發生於世界各葡萄產地，其種類甚多，已報告者有葡萄扇葉病（fanleaf）、捲葉病（leafroll）及木栓化病（Corky bark）等20餘種(3.5.7.11)。葡萄爲無性繁殖作物，且因國際性之交換苗木與引種，致帶毒苗木之擴散蔓延，形成葡萄產

1.臺灣省農業試驗所植病系　副研究員及助理研究員。　臺灣省　臺中縣　霧峰鄉
Associate Plant Pathologist and Assistant Plant Pathologist, respectively, Department of Plant Pathology, TARI, Wu-feng, 41301, Taichung, Taiwan. R. O. C.

業之嚴重損失。葡萄病毒病，在不同品種上與不同季節環境下，有不同病徵反應，亦易在高溫季節隱避病徵（masking）。田間葡萄品種，因病毒病徵隱避或生理病或元素缺乏症之混淆，致不易判別其病徵，故除扇葉病毒羣（fanleaf group viruses）爲可經汁液傳染之病毒外，其餘之病毒皆需賴費時之葡萄屬檢定品種（*Vitis* indicator plants）之嫁接檢定（表一及表二）。

本省葡萄品種大部分來自國外，年來大量引進選種及育種之材料，本省葡萄目前尚無完整的檢疫制度，僅賴病徵診斷法作爲判別之依據，致因葡萄病毒病之隱避病徵及生理病病徵之混淆，使田間病毒病株難予發現而多年潛存於田間。目前本省中部已證實黃斑病毒病（grapevine yellow mottle disease）之存在（2），並發現其他多數疑似病徵病株分佈在各葡萄品種圃及田間（1），必須即早去除，期抑制其蔓延。

表一、世界早期報告的主要葡萄病毒病（田中，1977）

Table 1. Main virus diseases of grapevine reported in the world. (Tanaka, 1977)

病名	最早的報告	病原	分佈	傳播方式	發生品種
Fanleaf（扇葉）	1939年	球狀病毒 25—30nm	普遍在世界各地。	嫁接、汁液、線蟲。	vinifera 種及大部分之美國種。
Yellow mosaic（嵌紋）	1935年	球狀病毒 28—30nm	歐洲、北美洲、南美洲、南非、澳洲。	嫁接、汁液、線蟲。	多數vinifera種。
Vein banding（脈綠）	1962年	球狀病毒 30nm。	歐洲、北美洲、南非、澳洲。	嫁接、汁液、線蟲。	葡萄屬品種。
Chrome mosaic	1965年	球狀病毒 30mm。	匈牙利。	嫁接、汁液、線蟲。	多數vinifera種及臺木品種。
Yellow vein（黃脈）	1956年	球狀病毒 28nm。	美國的加州。	嫁接。	vinifera種之數品種（Carigera, Empera等）。
Corky bark	1954年		美國的加州、義大利、墨西哥、南非、南斯拉夫。	嫁接。	vinifera種及*V. rupera*數品種。
Leafroll（捲葉）	1936年	絲狀病毒 13×790 nm?	歐洲、美國、墨西哥、南美洲、南非、新西蘭。	嫁接。	葡萄屬。
Asteroid mosaic	1954年		義大利、美國的加州、南非。	嫁接、（汁液）。	vinifera種之數品種及St. Georg。
Necrosis（壞疽）	1955年		捷克斯拉夫。	嫁接。	臺木品種爲主。
Enation	1929年		義大利、德國、南非、澳洲、匈牙利、美國。	嫁接。	vinifera種之數品種。
Legno riccio	1961年		義大利、以色列、南非、澳洲、匈牙利、美國。	嫁接。	labrusca種及vinifera種。
Flavescence doree	1957年	MLO	法國、德國、以色列、瑞士。	嫁接、葉蟬。	葡萄屬品種。
Pierce's disease	1892年		美國、墨西哥、（南美洲？）。	嫁接、葉蟬。	葡萄屬品種。

表二、世界早期報告之葡萄病毒病之主要病徵（田中1977）

Table 2. Major symptoms of grapevine virus disease reported in the world. (Tanaka, 1977)

病名	主要病徵
Fanleaf	扇葉狀葉片之特異狀奇形葉（一部份品種），葉片之斑紋及非對稱形，新梢節間縮短，鹹葉化，果粒不齊，果房小形化，季節中樹勢衰弱。
Yellow mosaic	早春葉片之斑紋狀變色，新梢黃化，果房小形化。
Vein banding	沿葉脈淡綠色或chrome yellow之帶斑狀斑紋，果粒不齊。
Chrome mosaic	早春葉片變色爲cream yellow或白色，葉片變形，結果不良，樹勢顯著衰弱。
Yellow vein	葉片黃色小斑點及沿葉脈有顯明黃色帶狀斑紋，著果不良。
Corky bark	樹皮龜裂爲凹目，新梢之不規則性生長成熟，形成變色斑，黑粒種葉片未變及向下捲葉。
Leafroll	葉緣向下捲葉，果實糖含量下降，成熟期遲延，果實著色不良，樹枝全株萎縮。
Asteroid mosaic	小葉脈附近之星狀斑點，葉片缺綠極深（夏季病徵變輕）。
Necrosis	葉片之不對稱型生長及葉脈間之黃綠色斑點，然後褐變及鹹壞，新梢生育伸長受阻，全株萎縮。
Enation	葉背沿主脈形成葉狀凸起（尤其在新梢基）。早春發芽遲延，新梢基端節間縮短。全株生育受阻。
Legno riccio	早春發芽遲延，樹皮變粗及木栓化，木質部及樹皮之形成層之部分凹裂（pitting），果實產量銳減，樹勢衰弱。
Flavescence doree	葉片下垂，向葉片捲曲而乾硬化，其日晒部分之黃化，新梢下垂久呈綠色而不成熟，冬季枯死，部分果實鹹皮苦味，全株生育受阻。
Pierce's disease	葉緣及主脈尖端突然呈日燒狀乾化褐變，落葉，枝條生育成熟不均勻而部分殘留綠色部，果實在採收前萎縮乾化，全株生育遲延及衰弱。

材料與方法

（一）葡萄黃斑病毒病之病毒純化及抗血清製作：將已分離檢定之黃斑病的病原 Tomato ringspot virus（TmRSV），接種在胡瓜（*Cucumis sativus* 'National pickling'）、千日紅（*Gomphrena globosa*）、菸草（*Nicotiana debneyi*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* 'Burley 21'）作爲病毒材料（1.3.4.6.10）。在5種病葉材料中，以千日紅及 *N. benthamiana*病毒含量最高，故用*N. benthamiana*病葉爲材料，參照 Stace-Smith (1966)（9）病毒純化方法，經高低速離心，硫酸銨沉降及等密度離心等步驟，進行病毒純化。以純化之病毒注射兔子，製作抗血清（6），並進行田間葡萄病葉材料之ELISA。

（二）臺中區產地及種苗圃葡萄品種黃斑病之病毒檢定：在臺中、彰化、南投主要葡萄產地及農試所之引進品種與砧木苗圃，採集擬斑紋病葉，進行檢定試驗，並以製作之抗血清進行ELISA，分析各地採集材料之罹病率。

（三）電子顯微鏡觀察：以病毒檢定植物汁液接種形成之病斑及病毒純化材料，進行超薄切片及陰染法之電子顯微鏡觀察、分析病毒形態大小及類型。

結　果

葡萄黃斑病之病毒分離株，分別接種在胡瓜、蕃茄及菸草，可顯現不同病徵，在 *N. debenyi*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* 'Burley 21'，接種植物中，以*N. benthamiana*接種經10天之病葉之病毒濃度較高，爲良好之病毒純化材料。以G614分離株接種在*N. benthamiana*進行病毒純化試驗（9），其純化程序如下：

N. benthamiana leaves 180g
+250ml boric acid+0.8g ascobic acid
↓
blending→frozen for 4hr.→thawed→centrifugate 10,000rpm 30min (4°C)
↓
supernant 330ml+$(NH)_2SO$ (15g/100ml)
↓
stir overnight at 4°C
↓
centrifugate 10,000rpm 30min (4°C)
↓
supernant→centrifugate 28,000rpm 2hr. (4°C)
↓
pellet in 0.01M Na_2–EDTA resuspend
↓
stir overnight
↓
centrifugate 8,000rpm 10min (4°C)
↓
supernant+26% caesium sulfate
↓
centrifugate 38,000rpm(23hr.)→ virus band dialyzed with 0.01M phosphate buffer

純化病毒經接種在紅藜得局部斑點，以電子顯微鏡觀察結果有多數球型病毒顆粒，直徑約26—30nm。

G614純化病毒經注射兔子四次（每週一次），並採血六次，得血清180ml。抗體力價以 double diffusion測定結果，稀釋32倍仍有反應。抗體與抗原之ELISA測定，病汁液稀釋 10^2，10^3，10^4 倍，另以健全者爲對照之結果，其病汁液10^3倍稀釋者尚有顯著之反應。

葡萄田間調查，採集疑似病毒病株，在新社等17個地點尋找類似病毒病徵之葡萄病株計430株，經以 G614 抗血清及國外引進之 TmRSV, grapevine fanleaf virus (GFLV), grapevine chrome mosaic (GCMV), grapevine Bulgarin latent virus (GBLV) 等4種病毒之抗血清進行 ELISA測定結果，其中與G614抗血清有反應者17株（4%），與 TmRSV抗血清有反應者46株（10.7%），與GFLV抗血清有反應者75株（17.4%），與GCMV抗血清有反應者0，與 GBLV 抗血清有反應者36株（8.4%），合計430株病株中，有40.4%與供試病毒抗血清有反應，詳見表三。

另外逢機抽樣調查臺中、彰化及南投三區域1742株葡萄樣本，有240株（13.8%）的樣本具有類似黃斑病毒病徵，經ELISA檢定，其中22株（1.3%）與黃斑病毒（G614）抗血清有反應，詳見表四。

葡萄病毒病試驗田中具斑紋病徵的病株，經三種病毒抗血清（TmRSV, GFLV, GBLV）之ELISA測定結果，供試的32株病株中，16株（50%）與TmRSV 抗血清有反應，26株（81.3%）與 GFLV 抗血清有反應，7株（21.9%）與 GBLV 抗血清有反應

表三、葡萄病毒田間似病毒病株採集經 ELISA 測定結果。(76年3月)

Table 3. Virus identification of diseased grapevines in the field by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (March 1987)

地區	似病株樣品株(株)	ELISA 測定結果					病株率 %
		G614	TmRSV	GFLV	GCMV	GBLV	
新社	29	1+	—	—	—	—	3.4
彰化	2	—	—	—	—	—	0
溪湖	2	—	—	—	—	—	0
埤頭	39	—	—	—	—	—	0
農試所園藝系	70	—	3+	—	—	—	4
網室葡萄病株	76	2+	—	9+	—	5+	21.1
東勢	3	—	—	1+	—	—	33
網室葡萄病株	15	—	—	6+	—	4+	53.3
信義	66	—	—	—	—	—	0
東興	4	4+	3+	4+	—	2+	100
東勢	8	1+	2+	2+	—	1+	75
東勢	4	1+	—	2+	—	2+	100
國姓	13	2+	5+	6+	—	3+	46
中興	26	5+	16+	17+	—	12+	65
草屯	2	—	—	—	—	—	0
中興	66	1+	16+	27+	—	7+	47
網室葡萄	5	—	1+	1+	—	—	40
合計	430	17+	46+	75+	0	36+	
百分率(%)		4	10.7	17.4	0	8.4	40.4

表四、中部葡萄田間調查採集及G614抗血清ELISA測定

Table 4. Results of ELISA using antibody against G614 to detect the virus occurrence in the fields of middle Taiwan.

地區	地點	調查株數	黃斑疑似病株	似病株率(%)	ELISA 測定有反應株數	病毒株率(%)
臺中縣	新社	410	62	15.1	+5	1.2
	東勢	160	27	16.9	+4	2.5
	農試所	192	25	13	+4	2.1
	后里	80	16	20	+1	1.3
彰化縣	二林	250	31	12.4	+3	1.2
	永靖	120	13	10.8	+2	1.7
	員林	180	22	12.2	+3	1.7
南投	信義	280	38	13.6	0	0
	雙冬	70	6	8.6	0	0
合計		1,742	240	13.8	22	1.3

表五、葡萄斑紋病試驗田（中興）病株之病毒種類ELISA測定結果（76年6月3日）

Table 5. Results of ELISA to detect virus on plants showing mottle symptom of experimental field in Chungshing.

田間似病株編號	ELISA 反應結果			田間似病株編號	ELISA 反應結果		
	TmRSV	GFLV	GBLV		TmRSV	GFLV	GBLV
1	−	+	−	38	−	+	−
2	−	+	−	40	−	+	+
9	−	+	−	41	+	+	+
10	−	+	−	46	+	+	−
12	−	+	−	47	+	+	+
13	+	−	−	49	+	+	+
16	+	+	−	51	−	+	−
18	+	+	−	54	+	−	−
20	+	+	−	56	+	−	+
23	+	−	−	57	+	+	+
25	+	−	−	58	−	+	−
27	+	+	−	61	−	+	−
28	+	−	−	64	−	+	−
29	−	+	−	65	+	+	+
30	−	+	−	66	−	+	−
32	−	+	−	合計32株	+16	+26	+7
37	−	+	−	百分率%	50	81.3	21.9

，其中部分病株與2種以上之病毒抗血清有反應，詳見表五。

又以 TmRSV及GFLV抗血清檢定本所葡萄種源庫內呈現疑似黃斑病毒病徵的69個葡萄品系中，發現S1207、S1076、S1191等3個品系與 TmRSV抗血清反應，然未見有GFLV抗血清反應之存在。

討　論

巨峰係由日本引進，在本省多年栽培且較爲耐病毒之品種，在高溫季節易導致畸型及病徵隱避，而葡萄病葉材料之血清反應又很不穩定，增加判別之困難，致減低田間調查檢定效益。本報告ELISA結果，尚待檢定證實。葡萄病毒多數潛伏存在且種類甚多，目前已普遍分佈於世界各地區(4.7)。本省葡萄品種皆由國外引進，其病毒之蔓延，勢在難免，而本省葡萄品質低劣之主要原因爲何？品種、栽培、管理、土壤、氣候環境及病蟲害等因素之影響如何？又如何加强研究改進？俾提高品質，巨峰品種是否眞具有耐病毒特性？進口苗木之檢疫等，皆有待各有關單位及人員，以團隊方式，努力改進，始可克服難題，俾改善本省葡萄產業。

參考文獻

1. 陳慧璘、曾德賜、陳脈紀 1981 臺灣葡萄黃化萎縮病（新毒素病）之初步研究・科學月刊 9 ：584—591。
2. 楊一郎、鄧汀欽、陳脈紀 1986 臺灣葡萄汁液傳播性黃斑病毒病之發生・中華農業研究 35：504—510。
3. Cadman, C. H., H. F. Dias and B. D. Harrison. 1960. Sap-transmissible viruses associated with diseases of grapevines in Europe and North America. Nature 187 : 577—579.
4. Converse, R. H. 1972. Recommended virus-indexing procedures for new USDA small fruit and grape cultivars. Plant Dis. Reptr. 63 : 848—851.
5. Goheen, A. C. 1977. Virus and Virus-like diseases of grapes. Hort. Science 12 : 465—469.
6. Gonsalves, D. 1979. Detection of tomato ringspot virus in grapevines: a comparison of *Chenopodium quinoa* and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plant Dis. Reptr. 63 : 962—965.
7. Hewitt, W. B. 1968. Viruses and Virus diseases of the grapevine. Rev. Appl. Mycol. 47 : 433—455.
8. Mink, G. L. and J. L. Parsons. 1975. Rapid indexing procedures for detecting yellow speckle disease in grapenivne. Plant Dis. Reptr. 59 : 869—872.
9. Stace-Smith R. 1966. Purification and properties of tomato ringspot virus and an RNA-deficient component. Virology 29, 240—247.
10. Tanaka, S. 1976. Indexing grapes in Japan for viruses. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42 : 192—196.
11. 田中寬康 1977 ブドウウイルス病の種類と我が國の現狀・植物防疫（日本）31 (10) ：414—418。

Summary

Some virus-like disorders showing yellow mottle or yellow vein symptoms on grapevines were found in some vineyards in Taichung areas. These diseases were confirmed to be transmitted to herbaceous indicator plants by mechanical inoculation of sap. Five virus isolates were isolated from single lesions. Two isolates of them were confirmed to be a strain of tomato ringspot virus (TRSV). Spherical virus particles with a diameter of 26-30 nm were observed. Antiserum against G614 virus isolate was produced. By ELISA test in field, of 430 virus-like vine collections tested, 4%, 10.7%, 17.4% and 8.4% showed positive reaction to antisera against G614, TRSV, GFLV and GBLV, respectively. Of 1742 vines tested, 1.3% showed positive reaction to antiserum against G614. Of 69 tested lines of grapvine in TARI, 3 of them (S1207, S1076, S1191) showed positive reaction to antiserum against TRSV, but all of them showed negative result to antiserum against GFLV.