台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(4):360–371 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06204.06

番椒斑駁病毒之鑑定與發生調查

鄭櫻慧 [1,*]　鄧汀欽 [2]　陳金枝 [3]　關政平 [4]　張清安 [5]

摘要

鄭櫻慧、鄧汀欽、陳金枝、關政平、張清安。2013。番椒斑駁病毒之鑑定與發生調查。台灣農業研究 62(4):360–371。

甜椒 (*Capsicum annuum*) 葉片出現嵌紋及扭曲變形疑似病毒感染的病徵，經直接法 ELISA 檢測，這些樣本可與辣椒葉脈斑駁病毒 (*Chilli veinal mottle viru*; ChiVMV) 的抗體反應，且汁液接種可感染 *Nicotiana benthamiana*，但 *N. benthamiana* 中的病毒卻不與 ChiVMV 的抗體反應，也不感染紅藜、奎藜。經汁液系列稀釋後接種，可分離得一病毒純系，將其接種保存於 *N. benthamiana* 上，經寄主範圍試驗，結果只感染茄科植物，回接甜椒即在葉片出現嵌紋及扭曲變形病徵。抽取接種的 *N. benthamiana* 葉片之總量 RNA，利用 potyvirus 的簡併式引子 (HRP5/dT) 進行反轉錄聚合酵素連鎖反應，可增幅得到 1.3 kb 的 DNA 片段。進行選殖及定序分析並與 GenBank 之核苷酸序列比對，與番椒斑駁病毒 (*Pepper mottle virus*; PepMoV) VB 分離株的鞘蛋白基因 (Access No. AB126033) 相同度達 100%，因此鑑定本病毒是一株 PepMoV。純化上述接種繁殖於 *N. benthamiana* 的病毒分離株 (PepMoV-TW1) 製備多元抗血清，利用其抗體以 ELISA 進行病毒偵測，自 2007 至 2011 年採自台灣各地 969 個甜椒樣本中有 20% 可測到 PepMoV，且多數與 ChiVMV 或番椒葉脈斑駁病毒 (*Pepper veinal mottle virus*; PVMV) 複合感染。因 PepMoV 與馬鈴薯病毒 Y (*Potato virus Y*; PVY)、PVMV 及 ChiVMV 等病毒有血清關係且彼此產生交互反應，使以往 ELISA 的結果之判別及病毒種類鑑定受到干擾，且甜椒中病毒複合感染的情況極為普遍，因此推測 PepMoV 可能之前就已存在於台灣。

關鍵詞：番椒斑駁病毒、鞘蛋白、抗血清。

前言

番椒 (*Capsicum annuum* L.) 屬茄科番椒屬，原產於南美洲秘魯和中美洲墨西哥一帶。哥倫布發新大陸後，將番椒傳入西班牙和歐洲，經歐洲傳入印度，17 世紀始傳到中國。台灣甜椒栽培始於 1960 年後，由美國引進栽培。危害甜椒的病害種類眾多，主要有疫病、青枯病、細菌性斑點病、炭疽病、白絹病、白粉病、果實腐敗病、根瘤線蟲和病毒病害等 (Green & Kim 1991)。番椒作物病毒病害田間複合感染的情形相當普遍，台灣已發生的病毒包括：煙草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*; TMV)、番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*; ToMV)、番椒微斑駁病毒 (*Pepper mild mottle virus*; PMMoV) (Green *et al*. 1987; Green & Wu 1991)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) (Hsu *et al*. 1989)、馬鈴薯病毒 Y (*Potato virus Y*; PVY) (Lee 1970)、番椒葉脈斑駁病毒 (*Pepper veinal mottle virus*; PVMV) (Cheng *et al*. 2009)，辣椒葉脈斑駁病毒 (*Chilli veinal mottle virus*; ChiVMV) (Tsai

投稿日期：2013 年 7 月 25 日；接受日期：2013 年 10 月 3 日。
* 通訊作者：yhcheng@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[5] 朝陽科技大學生化科技研究所教授。台灣 台中市。

et al. 2005)、番椒斑駁病毒 (*Pepper mottle virus;* PepMoV) (Cheng *et al*. 2011)、番茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spottd wilt virus*; TSWV) (Zheng *et al*. 2010)、番椒黃化病毒 (*Capsicum chlorosis virus*; CaCV) (Huang *et al*. 2010) 和番茄黃化捲葉病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*; TYLCV) (Shih *et al*. 2010)。除了 TMV、ToMV 和 PMMoV 由機械傳播外，其餘病毒均可經由機械操作和媒介昆蟲傳播，其中 CMV、PVY、PVMV、ChiVMV 及 PepMoV 可經由蚜蟲傳播，TSWV 和 CaCV 經由薊馬傳播，番茄黃化捲葉病毒只經由銀葉粉蝨 (*Besisia argentifolii*) 傳播。

PepMoV 是 Potyviridae 科 Potyvirus 屬的一員 (Shukla *et al*. 1994; Ward *et al*. 1995)，病毒顆粒呈略彎曲長桿狀，長度約爲 680–900 nm，基因體約爲 10 kb。主要危害茄科作物。媒介蚜蟲以非永續性傳播 (Shukla *et al*. 1994)，田間也可經由摘心採果等農事操作在植株間傳佈。PepMoV 首先報告於美國佛羅里達 (Zitter 1972; Purcifull *et al*. 1975)、亞利桑那 (Nelson & Wheeler 1972, 1978)、加州 (Nelson & Wheeler 1978; Vance *et al*. 1992)、德州 (Villalon 1975)、喬治亞州 (Benner *et al*. 1985) 與新墨西哥州 (Rodríguez-Alvarado *et al*. 2002) 等地，之後在夏威夷 (Melzer *et al*. 2012) 與古巴 (Quiñones *et al*. 2011) 亦有發現此病毒的報告。PepMoV 在亞洲首見於日本 (Ogawa *et al*. 2003) 與韓國 (Lee *et al*. 2004)，台灣也發現此病毒 (Cheng *et al*. 2011)。本研究將針對 PepMoV 台灣分離株之寄主範圍、抗血清製備與鞘蛋白序列分析並初步調查本病毒在番椒上之發生情形。

材料與方法

病毒之分離與寄主範圍測定

2006 年 8 月自南投縣埔里鎮與 2008 年自台南縣後壁鄉採集葉片呈現嵌紋、扭曲變形疑似病毒感染之甜椒樣本，這些樣本利用酵素連結免疫分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 檢測時都與辣椒葉脈斑駁病毒 (*Chilli veinal mottle virus*; ChiVMV) 的抗血清正反應。採集自南投縣埔里鎮彩色甜椒葉片呈現嵌紋及植株矮化之疑似病毒感染病徵，取其葉片以 50 倍量 (W/V) 磷酸緩衝液 (0.01M $KHPO_4$, pH 7.0) 研磨後，接種於灑有 400 目金剛砂之圓葉煙草 (*Nicotiana benthamiana*) 葉片。出現嵌紋病徵之 *N. benthamiana* 葉片以 10 倍量磷酸緩衝液研磨後，以磷酸緩衝液系列稀釋後接種於 *N. benthamiana* 葉片，觀察接種成功比例。

分離病毒時，以 500 倍量磷酸緩衝液研磨後，接種於 *N. benthamiana* 葉片，待其葉片出現病徵後，採取其中一株的葉片重複上述稀釋及接種步驟，如此重複 3 次，選擇最後出現嵌紋病徵之一株煙草視爲一分離株。單一分離株接種於 *N. benthamiana* 及甜椒 (*C. annuum*)，作爲本試驗接種源或於浸泡於 50% 甘油中置於 -20℃長期保存。

取罹病 *N. benthamiana* 葉片粗汁液作爲接種源，依前述方法接種藜科 (Chenopodiaceae)、龍膽科 (Gentianaceae) 和茄科 (Solanaceae) 等 4 科 15 種植物 (表 1)，置於溫室中連續 6 wk 觀察病徵發展，並摘取葉片進行 ELISA 檢測。

病毒之純化與抗血清製備

以接種經過約 15 d，出現病徵的 *N. benthamiana* 葉片作爲病毒純化材料，依 Gonsalves & Ishii (1980) 的方法進行純化但略加修改。每克病葉加入 2 mL 0.5 M PE 萃取緩衝液 (pH 7.5) 以果汁機打碎，過濾後加入氯仿及四氯化碳 (各 0.5 mL g^{-1}) 淨化，經低速離心去除綠色殘渣。上層液加入 8% PEG6000，於 4℃下攪拌後，經低速離心取其沉澱物，以 0.1 M PE 緩衝液 (pH 7.0) 懸浮，再經低速離心去除綠色殘渣。上澄液加入 8% PEG 及 0.3 M NaCl，攪拌後經低速離心，沉澱物以 0.1 M PE 緩衝液懸浮，同樣經過低速離心去除殘渣後加入 15% (W/V) 硫酸銫 (Cs_2SO_4)，溶解後取此溶液加至下層墊有 53% 硫酸銫之 PE 緩衝液中，離心 16 h。吸取綿密狀病毒層，以 0.1 M PE 緩衝液透析後以光譜儀 (Hitachi UV-2000 spectrophometer，日本) 於波長 320 nm

至 200 nm 自動掃描，並依 260 nm 波長的吸收光度計算病毒濃度。純化所得之病毒作爲委外製備抗血清之用。

以純化病毒爲抗原，委外製備抗血清，再以所得抗血清純化免疫球蛋白 (IgG)，作爲 ELISA 或 Western blotting (Clark & Adem 1977) 之用。

酵素連結免疫分析 (ELISA)

本試驗參照以往之研究報告進行 (Clark & Adem 1977)，取 0.1 g 之罹病葉組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入 ELISA 反應盤內，每樣品二個重複，置於 37℃生長箱 4 h 進行覆膜反應 (coating reaction)；然後以 PBST 緩衝液 (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 沖洗 3 次；其次加入供試抗體後，放置在 37℃定溫箱反應 2 h；再以 PBST 緩衝液沖洗 3 次後，加入已溶於磷酸緩衝液 (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 之山羊抗兔二次抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobin, Jackson, West Grove, PA, 100 μL 孔$^{-1}$)，置於 37℃之定溫箱中反應 2 h；最後再以 PBST 緩衝液沖洗 4 次後，再以 μL 孔$^{-1}$ 之比例加入濃度爲 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (ρ-NPP, Amresco, Solon Ind., Ohio, USA) 進行呈色反應。反應後 20 至 30 min，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Mlolecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作爲評估病毒濃度高低之依據。樣品讀值大於健康葉片之 2 倍者，視爲正反應。

西方漬染法 (Western blotting)

取 0.1 g 供試之病葉組織，以液態氮磨碎後，加入 200 μL 之樣品處理液 (75 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 30% glycerol, 6% SDS, 9% β-Mercaptoethanol, 0.015% Bromophenol blue)，研磨液加熱處理後經 SDS-PAGE 電泳，膠體上之蛋白轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，再以病毒抗血清進行漬染反應。

RNA 之抽取及反轉錄—聚合酶連鎖反應

取 100 mg 的病葉，利用總量 RNA 純化試劑組 (Total RNA extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany) 進行 RNA 之萃取，得到總量 RNA。病毒 RNA (viral RNA) 之抽取則取純化病毒以病毒 RNA 純化試劑組 (Viral RNA extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany) 進行萃取。以純化所得之 RNA 進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-ploymerase chain reaction; RT-PCR)，RT-PCR 以單一步驟 RT-PCR 試劑組 (Genemark Co., Taichung, Taiwan) 進行，25 μL 的反應液中加入 1 μL 的 RNA，各 2.5 μL 之 20 μM 簡併式引子 Hrp5/Pot1 (Pappu *et al*. 1993)。RT-PCR 之進行於於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中，設定反應程序爲 50℃下進行反轉錄 30 min，94℃變性 1 min 30 s；後進行 30 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min，50℃下鍊合 1 min 30 s，72℃下聚合 2 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長爲 6 min。反應產物以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME USA) 進行分析。

基因選殖及定序分析

RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段以小量膠體 DNA 回收組 (Genemark Co., Taichung, Taiwan) 回收 DNA，以 TOPO TA-PCR Ⅱ Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 進行選殖。篩選得到之選殖株抽取質體經限制酶 EcoRI 酶切確認插入 DNA 大小後，用於進行定序分析。定序反應委託明欣生物科技公司 (City, Country) 進行。定序所得之核苷酸序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc. Wesconsin, USA) 分析軟體進行連接，並與 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 上已登錄之核苷酸序列進行分析比對，再以 PALM: Phylogenetic Reconstruction by automatic Likelihood Model Selector (http://palm.iis.sinica.edu.tw) (Chen *et al*. 2009) 作成親緣關係樹狀圖。

病毒發生調查

利用本實驗製備的抗血清所抽取的純化免疫球蛋白 (IgG)，加上實驗室先前製備的感染番椒病毒 TMV (亦與 ToMV、PMMoV 反應)、CMV、PVY、ChiVMV (亦與 PVMV 反應)、TSWV、CaCV 等病毒之 IgG，針對各縣市採集之番椒疑似病毒病害標本進行 ELISA，調查病毒在番椒上的發生情形。

結果

病毒分離與寄主植物測定

利用罹病葉片汁液進行接種試驗，結果在紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 及奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 接種葉出現黃色圓斑，在 *N. benthamiana* 上位葉出現嵌紋病徵。再次以 ChiVMV 抗血清檢測，造成紅藜及奎藜葉片圓斑的病毒仍呈現正反應，但造成 *N. benthamiana* 嵌紋病徵的病毒則呈現負反應，因此發現感染 *N. benthamiana* 的病毒與感染紅藜及奎藜者不同，不爲 ChiVMV。

利用 *N. benthamiana* 病葉汁液再接種，於紅藜、奎藜接種葉皆無黃斑出現，甜椒則出現葉片嵌紋及扭曲變形病徵。因感染 *N. benthamiana* 之病毒不感染紅藜或奎藜，無法以單斑分離純系病毒，因此以系列稀釋法分離純化病毒。取 *N. benthamiana* 病葉以 10 倍量磷酸緩衝液研磨，再以 10 倍、100 倍與 1,000 倍緩衝液稀釋接種於 *N. benthamiana*，其中 100 倍稀釋接種的 20 棵植物都出現嵌紋病徵，1,000 倍稀釋接種的 20 棵中只有 1 棵出現病徵，因此連續 3 次以 500 倍稀釋接種源進行病毒分離，得到埔里分離株 (PepMoV-TW1) 與後壁分離株 (PepMoV-HB1)，接種於 *N. benthamiana* 上繁殖，作爲本試驗接種源或取病葉組織浸泡於 50% 甘油中置 -20℃長期保存。

機械接種 3 科 15 種植物中，PepMoV-TW1 只感染茄科寄主，不感染藜科、葫蘆科及豆科的供試植物 (表 1) (圖 1)，PepMoV-TW1 除了感染甜椒、辣椒及各品種煙草外，也感染矮牽牛 (Petunia × hybrid)、酸漿 (*Physalis angulate*) 和番茄 (*Solanum lycopersicum*)，在這 3 種植物上雖只造成植株矮化，但以 ELISA 檢測確認病毒感染。PepMoV-TW1 除了在甜椒、辣椒和 *N. benthamiana* 葉片造成明顯嵌紋和植株矮化之外，其他測試植物只造成矮化，葉片未觀察到明顯病徵。PepMoV-HB1 之寄主範圍與 PepMoV-TW1 相同，造成病徵亦相似。

與病毒之純化與抗體之製備

接種 PepMoV-TW1 的 *N. benthamiana* 葉片經上述純化步驟後所得病毒，其 A260/A280 比值爲 1.19，估算病毒回收量每 100 g 煙草之收量約 3.2 mg 純化病毒。製備所得抗血清其純化之 IgG，稀釋至 1 mg mL^{-1}，可再稀釋至 1,000 倍作爲 ELISA 與西方漬染法之試劑。

病毒鞘蛋白分子量與西方轉漬法分析

純化的病毒、罹病甜椒與番茄經 SDS-PAGE 與西方轉漬法分析，其鞘蛋白分子量介於蛋白標誌 27 至 41 kDa 之間，推估其分子量約爲 32 kDa (圖 2)，符合馬鈴薯 Y 病毒群分子量 (Shukla *et al*. 1994)。

番椒斑駁病毒與其他感染番椒之馬鈴薯 Y 病毒屬病毒之血清相關性

利用 indirect ELISA 比較台灣已知感染甜椒之 PVMV、ChiVMV 及 PVY 與 PepMoV-TW1 之血清相關性。各以 4 種病毒感染的 10 棵甜椒爲樣本，分別與前述 IgG 及實驗室製備的 3 種病毒多元抗體純化所得 IgG 進行試驗，PepMoV-TW1 之 IgG 除了與病毒本身感染甜椒呈色 40 min 之後反應值已達 3.02，但與 PVY 感染甜椒反應值 1.80，與 PVMV、ChiVMV 感染甜椒反應值 0.71 與 0.69。PepMoV-TW1 與 PVY 血清相關性較 PVMV 與 ChiVMV 強 (表 2)，與 Moury *et al*. (2005) 報告相符。

PepMoV 二分離株鞘蛋白基因核苷酸之序列分析比對

利用偵測 Potyvirus 之簡併式引子 Hrp5 和 Pot1 (Pappu *et al*. 1993)，以接種 PepMoV-TW1 與 PepMoV-HB1 罹病甜椒的總量 RNA 進行 RT-PCR，反應結果以 1.2% agarose 電泳

表 1. 番椒斑駁病毒台灣分離株 TW1 與 HB1 在供試植物上之反應及與報告中其他國家分離株寄主範圍比較。

Table 1. Symptoms on different species of plants inoculated with Pepper mottle virus from Taiwan isolates (TW1 and HB1) and other isolates reported in Japan, Korea, and USA.

	Isolate of *Pepper mottle virus*				
Plant species	TW1[z]	HB1[z]	Japan[y]	Korea[y] (Tom-sd2)	America[y]
Chenopodiaceae					
Chenopodium amaranticola	-	-	-	**	NL
Chenopodium quinoa	-	-	-	**	-
Cucurbitaceae					
Cucurbita moschata	-	-	-	**	**
Cucumis sativus	-	-	-	**	**
Leguminosae					
Phaseolus vulgaris	-	-	-	**	**
Vicia faba	-	-	-	**	**
Solanaceae					
Capsicum annuum					
Chili pepper	M[x]	M	F, D	M	D, M
Green pepper	D, M	D, M	D, M	Mo/N	D, M
Nicotiana benthamiana	M	M	-	M	**
Nicotiana rustica	D	D	-	**	**
Nicotiana tabacum	Mo	Mo	Mo	M	Mo
Petunia × hybrida	D	D	VC, Mo	**	**
Physalis angulata	D	D	-	**	Mo
Solanum lycopersicum	D	D	-	VN	Mo, D
Solanum melongena	-	-	-	**	**

[z] Isolates of Pepper mottle virus from Taiwan: TW1 and HB1.
[y] Reported Isolate from Japan (Ogawa *et al.* 2003), Korea (Kim *et al*. 2008) and America (Purcifull *et al*. 1975; Nelson & Wheeln 1978).
[x] Abbreviation of symptoms: chlorotic spot (CS), crinkle (CR), dwarf (D), necrotic lesion (NL), mosaic (M), leaf mottle (Mo), fallen leaves (F), vein clearing (VC), vein necrosis (VN), no symptom (-), and no data (**).

分析，觀察到增幅出約 1.3 kb 之 DNA 條帶。

增幅之 DNA 片段選殖至 TOPO TA 選殖套組，所得之選殖株經定序後，共有 1,350 個核苷酸，包含病毒之部分 Nib 基因、鞘蛋白基因和 3' 非轉譯區。其中 PepMoV-TW1 部份在 GenBank 登記爲 Acc. No. HQ329082，PepMoV-HB1 部份爲 Acc. No. JX962777。PepMoV-TW1 與 PepMoV-HB1 分離株之鞘蛋白基因與 GenBabk 登錄之序列 PepMoV 鞘蛋白基因比對 (表 3)，利用 PALM 繪成親緣關係樹狀圖如圖 3。PepMov-TW1 鞘蛋白基因的 822 核苷酸與韓國的分離株 VB (Access No. AB126033) 之核苷酸相同度最高，達 100 %。

甜椒病毒病害發生調查

採集自南投、雲林、嘉義、台南、屏東、花蓮及台東的甜椒共計有 969 個樣本，檢測結果如表 4。檢測病毒中以 PVMV 感染比例最高，達 34.2%，其次爲其他 3 個 Potyvirus 屬的 PVY、ChiVMV 和 PepMoV 感染比例都在 20% 以上，CMV 感染比例爲 7.3%，PMMV 感染率合計達 11.8%，粉蝨傳播的 TYLCV 感染比例爲 11.1%，薊馬傳播的 CaCV 與 TSWV 感染比例爲 5.6% 與 9.0%，未檢測到上述病毒者 185 個樣本，佔 19.1%。檢測樣本中，PepMoV 多與 PVMV、ChiVMV 複合感染。檢測的辣椒樣本中，多爲 CMV 和 PVMV、



圖 1. 番椒斑駁病毒 TW1 分離株接種於甜椒 '女王星'[(A), 圖左]、辣椒 '萬里香' [(B), 圖左]、番茄 '農友 301' [(C), 圖左]、和煙草 [(D), 圖左] 所出現的病徵。(A)–(D)： 圖右爲未接種對照。TW1 分離株在甜椒 (A) 上引起嵌紋及葉片扭曲病徵；在辣椒 (B) 上引起之嵌紋病徵；在番茄 (C) 上引起之矮化病徵 ; 與在煙草 (D) 上引起之嵌紋病徵。

Fig. 1. Symptoms of *Pepper mottle* virus- TW1 inoculated on green pepper cv. 'Knownyou 1501' [(A), left plant]; chili pepper cv.'Knownyou 1291' [(B), left plant]; tomato cv. 'Knownyou 368' [(C), left plant]; and *Nicotiana benthamiana* [(D), left plant]. Note symptoms of systemic mosaic and deformation on the plant of green pepper [(A), left]; systemic mosaic on chili pepper [(B), left]; drawfing on tomato [(C), left]; and systemic mosaic on *Nicotiana benthamiana* [(D), left]. Uninoculated plants [(A)–(D), right] were healthy.

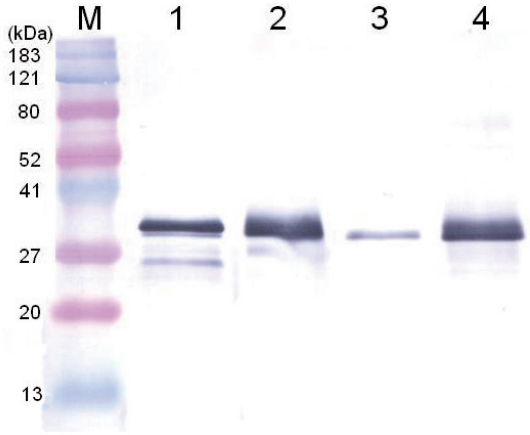


圖 2. 利用西方漬染法分析番椒斑駁病毒感染之番茄與甜椒。行 1：罹病蕃茄；行 2：罹病甜椒；行 3：未接種甜椒；行 4：純化病毒；行 M：蛋白分子量標誌。

Fig. 2. Western blotting analysis of PepMoV from inoculated plants of tomato and green pepper. Lane 1: virus inoculated on tomato; Lane 2: virus inoculated on green pepper; Lane 3: uninoculated green pepper; Lane 4: purified virus; and Lane M: protein markers.

表 2. 番椒斑駁病毒與感染台灣番椒作物其他馬鈴薯 Y 病毒屬病毒抗血清相關性。

Table 2. Reaction of four pepper viruses with polyclonal antibodies tested by the indirect ELISA method.

	Source of polyclonal antibody			
Virus[z]	PVMV	ChiVMV	PVY	PepMoV
PVMV	+++[y]	+++	–	+,–
ChiVMV	+++	+++	–	+,–
PVY	+	+	+++	++
PepMoV	–	–	+–	+++

[z] Viruses from pepper: PVMV, *Pepper veinal mottle virus*; ChiVMV, *Chilli veinal mottle virus*; PVY, *Potato virus* Y; and PepMoV, *Pepper mottle virus*.

[y] Results of indirect ELISA: –, no serological reaction [absorbancesat 405nm (A405) < 2 times the non-inoculated control]; +, –, A405 between 2 and 5 times the non-inoculated control; +, A405 between 5 and 10 times the non-inoculated control; ++, A405 between 11 and 20 times the non-inoculated control; +++, A405 between 21 and 30 times the non-inoculated control.

表 3. 番椒斑駁病毒 PepMoV-TW1 (HQ329082) 與 PepMoV-HB1 (JX962777) 鞘蛋白基因核苷酸序列與同種病毒之比較。

Table 3. Comparison of identities of coat protein gene nucleotide sequences of PepMoV-TW1 (HQ329082) and PepMoV-HB1 (JX962777) with *Pepper mottle virus* isolates from other countries.

	Identity (%)		
Virus isolate (Accession No.)	TW1	HB1	Country[z]
TW1 (HQ329082)	100.0	97.3	Taiwan
Vb (AB126033)	100.0	97.3	Korea
57 (EU586121)	98.1	97.9	Korea
KP-3 (AB084486)	97.8	97.6	Korea
248 (EU586125)	97.9	97.9	Korea
205187 (EU586133)	98.3	97.8	Korea
JKK (AB098560)	98.5	98.7	Japan
Ca (M96425)	97.1	96.1	America
Poamoho (JQ429788)	96.1	95.7	America
NC165 (AF227728)	83.8	83.6	America
Florida (AF501591)	94.0	94.0	America
137 (JN222367)	92.8	92.7	Cuba

[z] References for isolates from Korea (Kim *et al*. 2009), Japan (Ogawa *et al*. 2003), America (Vance *et al*. 1992; Rodríguez-Alvarado *et al*. 2002; Melzer *et al*. 2012) and Cuba (Quiñones *et al*. 2011).

ChiVMV 複合感染，比例高達 80.5%，PepMoV 亦與前述 3 種病毒之一複合感染，但測得 PepMoV 比例只有 7.5% (數據未顯示)。

討論

根據上述寄主範圍試驗、病毒的鞘蛋白分子量、血清學反應、反轉錄聚合酶連鎖反應、序列比對試驗、及親緣分析的結果，確認感染南投埔里甜椒病毒 (PepMoV-TW1) 與台南後壁甜椒病毒 (PepMoV-HB1) 是番椒斑駁病毒的分離株。利用 PepMoV-TW1 的鞘蛋白製備多元抗血清，此抗血清雖與台灣茄科作物常見的 PVY 有中等血清反應，與 PVMV 與 ChiVMV 有較輕血清反應，若同時以上述 3 種抗血清進行 ELISA 檢測，若樣本只感染 PVY、PVMV 或 ChiVMV 時，可能有讀值較低之非專一性反應。

寄主範圍測定時，PepMoV-TW1 感染植物呈現矮化或斑駁等較輕微病徵，因此接種後

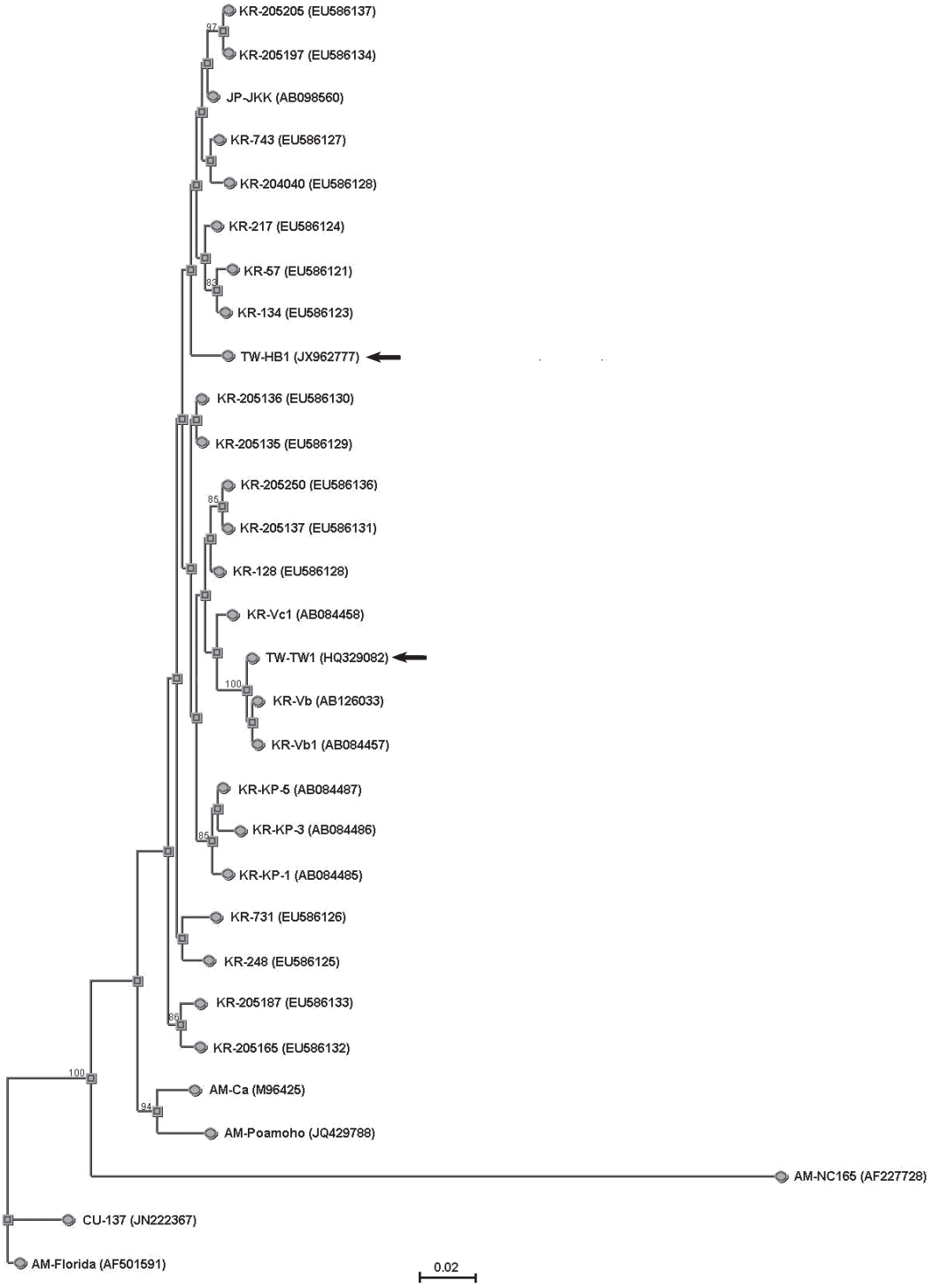


圖 3. 番椒斑白病毒鞘蛋白基因以 PALM 進行親緣關係分析之樹狀圖。

Fig. 3. Phylogenetic dendrogram of coat protein gene of PepMoV-TW1 (HQ329082) and PepMoV-HB1 (JX962777). The tree was generated by neighborhood-joining method (PALM). The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1,000 replications.

表 **4**. 自 2007 至 2011 年台灣中部地區甜椒病毒病害發生概況調查。

Table 4. Occurrence of virus diseases in sweet pepper collected in central Taiwan from 2007 to 2011.

Year	No. of plants assayed	Number and percentage of plants infected with virus[z]									
		PMMV	CMV	CaCV	TSWV	PVY	PVMV	ChiVMV	PepMoV	TYLCV	ND
2007	145	15 10.3%	1 0.7%	20 13.8%	0 0%	44 30.3%	52 35.9%	40 27.6%	18 12.4%	14 9.7%	36 24.8%
2008	231	20 8.7%	20 8.7%	15 6.5%	0 0%	56 24.2%	76 32.9%	42 18.2%	51 22.1%	18 7.8%	46 19.9%
2009	282	31 11.0%	26 9.2%	13 4.6%	51 18.1%	42 14.9%	90 31.9%	50 17.7%	70 24.8%	37 13.1%	53 18.8%
2010	169	30 17.8%	19 11.2%	6 3.6%	29 17.2	50 29.6%	54 32.0%	40 23.7%	43 25.4%	11 6.5%	39 23.1%
2011	142	18 12.7%	5 3.5%	0 0%	7 4.9%	21 14.8%	60 42.3%	23 16.2%	15 10.6%	28 19.7%	11 7.7%
Total	969	114 11.8%	71 7.3%	54 5.6%	87 9.0%	213 22.0%	332 34.2%	195 20.1%	197 20.3%	108 11.1%	185 19.1%

[z] Virus diseases: PMMV, *Pepper mild mottle virus*; CMV, *Cucumber mosaic virus*; CaCV, *Capsicum chlorosis virus*; TSWV, T*omato spotted wilt virus*; PVY, *Potato virus Y*; PVMV, *Pepper veinal mottle virus*; ChiVMV, *Chilli veinal mottle virus*; PepMoV, *Pepper mottle virus*; TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*; and ND, Sample did not detect the nine viruses.

再以 ELISA 確認感染。PepMoV-HB1 在接種植物上感染與否與病徵表現與 PepMoV-TW1 類似，因此表一僅以 PepMoV-TW1 呈現。PepMoV-TW1 致病性與美國的幾個分離株較相近 (Purcifull *et al*. 1975; Nelson & Wheeln 1978)，但 PepMoV-TW1 不感染 *Chenopodium amaranticola*，韓國與日本的分離株亦不感染 *C. amaranticola* (Ogawa *et al*. 2003; Lee *et al*. 2004)。測試植物中，PepMoV-TW1 感染茄子 (*Solanum. melongena*) 以外的茄科植物，雖然測試的二分離株都感染番茄 (*S. lycopersicum*) 引起矮化病徵，但田間番茄樣本未測到有 PepMoV 感染。

比對 GenBanK 登錄的鞘蛋白基因序列，台灣 2 分離株與日本 1 分離株，韓國 22 分離株的親源關係較爲接近 (Kim *et al*. 2009)，與美國、古巴或夏威夷的親源關係較遠，與地理分布似呈相關，但日本與韓國分離株在寄主植物上之病原性較台灣分離株強，這些疑點需要測試更多品種、病毒分離株與病毒全長度基因體定序分析來加以釐清。PepMoV 感染的番椒樣本都爲複合感染，所有供試樣本的中 PepMoV 都不感染實驗室常用的局部病斑寄主—紅藜與奎藜。因 ChiVMV 不感染 *N. benthamiana*，試驗中使用的二分離株才能順利從複合感染中分離出來，其他會感染 *N. benthamiana* 的 CMV 或 PVMV 之複合感染樣本中，PepMoV 的分離都失敗，日後將嘗試以其他產生單班寄主如 *Datura stramonium*、*Nicotiana glutinosa* 或 *N. tabacum* 進行分離。

病害發生調查的檢測樣本中，PepMoV 多數與 PVMV、ChiVMV 複合感染。甜椒在台灣多爲露天栽培，彩色甜椒則爲設施栽培，不論設施栽培或露天栽培，病毒病徵植株常呈現區塊存在，甜椒爲連續採果作物，且栽培過程需持續摘除側芽，推測可能去芽或採果時，刀具等造成病毒傳播。相較於甜椒，辣椒多爲露天栽培。傳統上認爲辣椒對病毒具有較高的抗 (耐) 病性，因此栽培上較爲粗放，一但栽培感病的品種，極易造成很高的病毒感染率，幾乎全園發病。檢測的樣本中，辣椒感染 PepMoV 的比例亦遠較甜椒低。

引用文獻

Benner, C. P., C. W. Kuhn, J. W. Demski, J. W. Dobson, P. Colditz, and F. W. Nutter. 1985. Identification and incidence of pepper viruses in northeastern Georgia. Plant Dis. 69:999–1001.

Chen, S. H., S. Y. Su, C. Z. Lo, K. H. Chen, T. J. Huang, B. H. Kuo, and C. Y. Lin. 2009. PALM: A paralleled and integrated framework for phylogenetic inference

with automatic likelihood model selectors. PLoS ONE 4:e8116.

Cheng, Y. H., R. Y. Wang, C. C. Chen, C. A. Chang, and F. J. Jan. 2009. First report of *Pepper veinal mottle virus* in tomato and pepper in Taiwan. Plant Dis. 93:107.

Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, J. Y. Liao, C. A. Chang, and C. H. Chiang. 2011. First report of *Pepper mottle virus* in bell pepper in Taiwan. Plant Dis. 95:617.

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483.

Gonsalves, D. and M. Ishii. 1980. Purification and serology of *Papaya ringspot virus*. Phytopathology 70:1028–1032.

Green, S. K. and J. S. Kim. 1991. Potyviruses. p.8–13. *in*: Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers: A Literature Review (Green, S. K. and J. S. Kim, eds.) AVRDC Technical Bulletin No. 18. Tainan, Taiwan. 60 pp.

Green, S. K. and S. F. Wu. 1991. Tobamoviruses on *Capsicum annuum* in Taiwan. Plant Dis. 75:1186.

Green, S. K., L. L. Hwang, and Y. J. Kuo. 1987. Epidemiology of tomato mosaic virus in Taiwan and identification of strains. Z. Pflanzenk. Pflanzen. 94:386–397.

Hsu, Y. H., F. Z. Lin, C. C. Hu, and S. C. Yin. 1989. Host reaction, serology and RNA pattern of cucumber mosaic virus isolates. Plant Prot. Bull. 31:51–59.

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 Dis. 94:1263.

Kim, Y. J., M. G. Jonsona, H. S. Choib, S. J. Koc, and K. H. Kim. 2009. Molecular characterization of Korean *Pepper mottle virus* isolates and its relationship to symptom variations. Virus Res. 144:83–88.

Lee, S. H., J. B. Lee, S. M. Kim, H. S. Choi, J. W. Park, J. S. Lee, K. W. Lee, and J. S. Moon. 2004. The incidence and distribution of viral diseases in pepper by cultivation types. Res. Plant Dis. 10:231–240.

Lee, S. T. 1970. Studies on some naturally occurring strains of *Potato virus Y* in Taiwan. Plant Prot. Bull. 12:41–50.

Melzer, M. J., J. S. Sugano, D. Cabanas, K. K. Dey, B. Kandouh, D. Mauro, I. Rushanaedy, S. Srivastava, S. Watanabe, W. B. Borth, S. Tripathi, T. Matsumoto, L. Keith, D. Gonsalves, and J. S. Hu. 2012. First report of *Pepper mottle virus* infecting tomato in Hawaii. Plant Dis. 96:917.

Moury, B., A. Palloix, C. Caranta, P. Gognalons, S. Souche, K. G. Selassie, and G. Marchoux. 2005. Serological, molecular, and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chili veinal mottle virus*. Phytopathology 95:227–232.

Nelson, M. R. and R. E. Wheeler. 1972. A new virus disease of pepper in Arizona. Plant Dis. Rep. 56:731–735.

Nelson, M. R. and R. E. Wheeler. 1978. Biological and serological characterization and separation of potyviruses that infect peppers. Phytopathology 68:979–984.

Ogawa, Y., K. Hagiwara, H. Iwai, S. Izumi, and K. Arai. 2003. First report of *Pepper mottle virus* on *Capsicum annuum* in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 69:348–350.

Pappu, S. S., R. Brand, H. R. Pappu, E. P. Rybicki, K. H. Gough, M. J. Frenkel, and C. L. Niblett. 1993. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: Application to dasheen mosaic virus. J. Virol. Methods 41:9–20.

Purcifull, D. E., T. A. Zitter, and E. Hiebert. 1975. Morphology, host range, and serological relationships of *Pepper mottle virus*. Phytopathology 65:559–562.

Quiñones, M., F. Arana, P. Alfenas-Zerbini, M. Soto, D. Ribeiro, A. Diaz, D. González, J. Carbonell, T. Depestre, and F. M. Zerbini. 2011. First report of *Pepper mottle virus* in sweet pepper in Cuba. New Dis. Rep. 24:16.

Rodríguez-Alvarado, G., S. Fernandez-Pavia, R. Creamer, and C. Liddell. 2002. *Pepper mottle virus* causing disease in chile peppers in southern New Mexico. Plant Dis. 86:603–605.

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 Dis. 94:637.

Shukla, D. D., C. W. Ward, and A. A. Brunt. 1994. The Potyviridae. CAB International. Cambridge. 516 pp.

Tsai, W. S., F. J. Jan, Y. C. Huang, and S. K. Green. 2005. Molecular characterization of five strains of Chilli veinal mottle virus (ChiVMV) in Taiwan. Plant Prot. Bull. 47:429–430.

Vance, V. B., R. Jordan, J. R. Edwardson, R. Christie, D. E. Purcifull, T. Turpen, and B. Falk. 1992. Evidence that *Pepper mottle virus* and *Potato virus Y* are distinct viruses: analyses of the coat protein and 3-untranslated sequence of a California isolate of *Pepper mottle virus*. Arch. Virol. 5:337–345.

Villalon, B. 1975. Virus diseases of bell peppers in south Texas. Plant Dis. Rep. 59:858–862.

Ward, C. W., G. F. Weiller, D. D. Shukla, and A. Gibbs. 1995. Molecular systematics of the Potyviridae, the largest plant virus family. p.477–500. *in*: Molecular Basis of Virus Evolution (Gibbs, A., C. H. Calisher, and F. Garcia-Arenal, eds.) Cambridge University Press. Cambridge. 624 pp.

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 Dis. 94:920.

Zitter, T. A. 1972. Naturally occurring pepper virus strains in south Florida. Plant Dis. Rep. 56:586–590.

Identification and Occurrence of *Pepper mottle virus* Isolated from Peppers in Taiwan

Ying-Huey Cheng[1,*], Ting-Chin Deng[2], Chin-Chih Chen[3], Cheng-Pin Kuan[4], and Ching-An Chang[5]

Abstract

Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, C. P. Kuan, and C. A. Chang. 2013. Identification and occurrence of *Pepper mottle virus* isolated from peppers in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 62(4):360–371.

Bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plants exhibiting systemic leaf mosaic and malformation were collected. By DAS-ELISA, these samples were positively reacted with antibody against *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV). After mechanical inoculation with sap extracted from these samples, unexpected mosaic symptoms were developed on upper leaves of *Nicotiana benthamiana*. The virus infecting *N. benthamiana* was non-reacted with antibody to ChiVMV when tested by DAS-ELISA. And the virus was non-infectious to *Chenopodium amaranticolor* and *Chenopodium quinoa* tested by sap-inoculation. Pure virus isolates were obtained from infected plants of *N. benthamiana* by mechanical inoculation with serially diluted saps of infected plants. Not only pepper plants were developed the mosaic and leaf distortion symptoms, but also some species of Solanaceae plants were found to be infected by this virus in the host range test. The total RNA extracted from leaves of inoculated *N. benthamiana* was subjected to RT-PCR. The potyvirus degenerate primers (Hrp5/Pot1) were used to amplify a RT-PCR product of 1.3 kb DNA fragment, which was then cloned and sequenced. Results of nucleotide sequencing revealed that the CP gene of the isolate was 100% identical to *Pepper mottle virus* (PepMoV)-VB (Access No. AB126033) and was concluded as an isolate of PepMoV. Polyclonal antiserum against PepMoV Taiwan isolate (PepMoV -TW1) was prepared by immunizing rabbit with purified virus that has been propagated in *N. benthamiana*. Use of its antibody in ELISA for virus detection, a total of 969 sweet pepper samples were collected from different areas of Taiwan and tested in 2007–2011. About 20% of all the survey samples were identified as PepMoV infection and most of them were complexly infected with ChiVMV, or *Pepper veinal mottle virus* (PVMV). It is speculated that PepMoV might already exist in Taiwan earlier, but it was ignored because the closely serological relationships among PepMoV, *Potato virus Y* (PVY), PVMV and ChiVMV could form cross-reactions with each other and that interfered with the judgment of ELISA. Besides, the virus complex infections were very common in plants of sweet pepper.

Key words: *Pepper mottle virus*, Coat protein, Antiserum.

Received: June 25, 2013; Accepted: October 3, 2013.
* Corresponding author, e-mail: yhcheng@tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Professor, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung, Taiwan, ROC.