由薄葉牛皮消(*Cynanchum taiwanianum* Yamazaki)所分離之胡瓜嵌紋病毒特性研究

楊淑惠[2] 陳滄海[1*] 曾 珍[1] 李文立[2] 曹麗玉[2] 陳金枝[3]

[1] 屏東縣內埔鄉 國立屏東科技大學植物醫學系
[2] 高雄市 行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所
[3] 台中市霧峰區 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

（接受日期：2014年12月1日）

摘 要

楊淑惠、陳滄海*、曾 珍、李文立、曹麗玉、陳金枝。2014。由薄葉牛皮消(*Cynanchum taiwanianum* Yamazaki)所分離之胡瓜嵌紋病毒特性研究。植保會刊 56(4): 109-136。

薄葉牛皮消 (*Cynanchum taiwanianum* Yamazaki)為蘿藦科台灣原生種植物，其地下塊莖可做為中藥材。2005年於台灣高雄縣內門鄉田間發現牛皮消植株葉片呈現疑似病毒性病害，受感染的植株葉片呈現嵌紋病徵，經電顯觀察結果發現，有球型病毒存在。內門鄉栽培區田間為88%，而網室栽培病徵變化調查，發現病徵表現與溫度有相關性，1-4月溫度較低病徵明顯，5-8月溫度較高病徵較不明顯。具嵌紋病徵之葉片汁液，經紅藜機械接種可成功分離出直徑約28 nm之球型病毒粒子，命名為SW-1分離株；其熱不活化溫度為65℃，耐稀釋度為10^{-5}，24℃及-80℃下，活性分別可維持96小時及12個月以上。每50克接種SW-1分離株的萬國士煙草病葉，經蔗糖梯度離心純化後，約可純化66.66 mg之病毒。寄主範圍測試12科74種植物，其中葫蘆科、藜科、茄科等7科32種植物會被感染並表現病徵。以凝膠電泳分析估算病毒鞘蛋白分子量為26 kDa。將純化病毒免疫注射於紐西蘭兔後，可製備出對應本病毒之力價 2048之專一性抗體；此抗體於西方轉漬反應(Western blotting)、瓊脂免疫雙向擴散反應(SDS-agar gel double diffusion test) 、間接式酵素連結免疫吸附法 (indirect ELISA)中，除可與同源抗原

* 通訊作者。E-mail: thchen@mail.npust.edu.tw，傳真：+886-8-7740293

反應外，亦會與胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*)發生專一性反應。以反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)選殖本病毒之鞘蛋白核酸，鞘蛋白基因定序共得全長889個核苷酸 (nucleotide, nt)，其所對應轉譯含218個胺基酸；將鞘蛋白核苷酸與胺基酸序列，與已登錄於NCBI GenBank之胡瓜嵌纹病毒分離株比對，發現其與由番茄分離之胡瓜嵌紋病毒核苷酸序列有高達99%的相同度 (D28780、AJ829779)，胺基酸序列則與CMV (Y10886、AF523340)有100%之相似度。綜合以上結果，顯示本研究由薄葉牛皮消嵌紋病株分離之球型病毒應為胡瓜嵌纹病毒，此為薄葉牛皮消病毒病害之首次報導。

(關鍵詞：牛皮消病毒病、胡瓜嵌紋病毒、病毒鑑定)

緒 言

薄葉牛皮消(*Cynanchum taiwanianum* Yamazaki)在分類上屬於龍膽目(Gentianales)、蘿藦科 (Asclep)，牛皮消屬(*Cynanchum*)[9]，英名為Taiwan swallowwort，別名為薄葉白薇、白首烏、白何首烏、牛皮消、台灣牛皮消、飛來鶴、萬能薯，為台灣固有植物，原產於中、南部山區，目前產於高雄縣內門鄉。台灣產蘿藦科的牛皮消依分類有四種，分別為牛皮消(*Cynanchum atratum* Bunge)、薄葉牛皮消(*C. taiwanianum* Yamazaki)、台灣牛皮消[(*C. formosanum* (Maxim.) Hemsl].、蘭嶼牛皮消 (*C. lanhsuense* Yamazaki)[14]薄葉牛皮消分為地上部之莖、葉及地下部之塊莖二部分，主要食用部位為塊根，莖為藤本、圓柱形，葉對生，具葉柄，柄長3-5公分，葉片心狀卵形，葉片長5-9公分，寬4-7公分，葉先端漸尖形，繖狀花序，鐘形花萼，花粉塊橢圓形，雌蕊具5稜，果實為蓇葖果[12]，花期為10月至隔年4月，栽培方式有植株直立式與匍匐式，以種子、扦插及種薯繁殖，以無性繁殖產量最佳，在一年四季中，更以秋季定植田間之產量最高，夏季則因高溫多雨，不適於地下塊莖生長而無顯著產量。

牛皮消具有可調節免疫系統[8]、解熱、抗炎、抗腫瘤[3,4]、護肝保健等功能，高雄縣內門鄉農會推廣為保健食品，其加工製成品業已經農業試驗所食品安全測試[10]，目前內門鄉栽培數量甚多，每年配合觀光季宣傳，已成為當地特產之一。

農業試驗所鳳山分所於2005年在高雄縣大內鄉發現薄葉牛皮消葉片上有嚴重嵌紋狀病徵，取田間病葉以電子顯微鏡觀察，發現內有球形病毒粒子，大小約為28 nm顯示其應為一種病毒病害，目前國內尚未有牛皮消病毒病害之文獻記載，因此本研究之目的為探討台灣地區牛皮消病毒病害其田間發生生態、病毒分離與鑑定、理化特性、血清學以及分子生物學進行探討，期能提供完整的

基本資料做為將來田間診斷與防治之參考。

材料與方法

田間病害發生調查

以內門鄉栽種之薄葉牛皮消做為病害調查樣區，調查田間葉片呈現嵌紋狀的病徵，參考Sophorn氏發表的方法[33]，在每個取樣區中依樣品數多寡，以20株為單位做一取樣區，每個取樣區採完全逢機設計 (CRD)調查20株薄葉牛皮消植株，每次共計調查100株，求取平均值計算其病害發生率 (%)。

薄葉牛皮消病徵變化與生體內病毒分佈調查

採自高雄縣內門鄉田間薄葉牛皮消病株種薯種植於鳳山園藝試驗所網室，自2006年5月至2008年4月間，每月調查這二地牛皮消嵌紋狀病徵葉片，病徵以目視法配合紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)分離接種，長期調查牛皮消葉部病徵變化情形，並將罹病級數分為0-3級：(0：無嵌紋病徵：1：嵌紋病徵佔整株面積1-30%； 2：嵌紋病徵佔整株面積31-60%；3：嵌紋病徵佔整株面積61-100%)。 另在完成病毒抗血清製備後，將植株之根、莖、葉、塊根進行Indirect ELISA測試，以了解病毒在牛皮消植株上分布情形。

病毒材料保存方法與接種分離

取嵌紋病徵之新葉，以10倍量0.1 M pH 7.0磷酸緩衝液 (phosphate buffer)研磨成汁液，機械接種於紅藜，葉片出現局部壞疽斑後，挑取單斑重複三次單斑分離並配合電子顯微鏡觀察，以獲得一純系病毒株SW-1保存於-80℃下供後續研究之病毒源。

寄主範圍測試

取前述被SW-1病毒株感染之新鮮紅藜病斑，機械接種於藜科、葫蘆科、茄科、豆科、蘿蔓科等12科74種供試植物，置於24℃室溫，連續觀察一個月，並記錄病徵表現情形，不論是否有病徵，皆以電子顯微鏡觀察並將其回接至紅藜上，以確認病毒的感染情形。

病毒之生體外物理性質測定

取前述被SW-1病毒株感染之新鮮奎藜病斑，以10倍量之0.1 M pH 7.0磷酸緩衝液(phosphate buffer)研磨成汁液，並以3000 rpm離心10分鐘取上層液進行病毒熱不活化溫度(thermal inactivation point)、耐稀釋度 (dilution end point)測定及24℃室溫與-80℃下之耐保存性(longevity in vitro)試驗。每一個處理經三重覆，接種至3株株齡一致，各具五片成熟葉之健康紅藜，待3天後出現局部性病斑，計算每片葉之病斑數，瞭解SW-1病毒株在生體外之活性變化。

電子顯微鏡觀察

取田間病葉、單斑分離後的紅藜病葉及純化之病毒[7]，滴於覆有formvar並經碳補強之銅網 (grid)上後，隨即進行2%醋酸鈾 (uranyl acetate) 染色15分鐘，以穿透式電子顯微鏡(Hitachi, H-7500)觀察病毒粒子形態。

蚜蟲媒介傳播測試

田間薄葉牛皮消植株上發現夾竹桃蚜於其上取食，由於蚜蟲為傳播CMV的媒介昆蟲之一，以此為蟲媒。以健康不帶毒之夾竹桃蚜 (*Aphis nerii*)置於健康馬利筋 (*Asclepias curassavica* L.)上強制培養2-3代後[1,7]，取其各齡期之蚜蟲置於培養皿上進行飢餓處理2小時，而後移至接種SW-1分離株發病之馬利筋葉片上，讓其取食30分鐘後挑起夾竹桃蚜移至健康馬利筋植株上，接種2小時以進行非永續傳播，每株馬利筋接種20隻蚜蟲，每次三株，而後將夾竹桃蚜蟲挑去，並噴灑9.6%益達胺 (Imidacloprid)乳劑1000倍，重複三次，連續觀察4週有無病徵出現，並以ELISA與電子顯微鏡確認蚜蟲接種植株有無被病毒感染。

病毒純化與抗血清製備

病毒之純化：以機械接種SW-1分離株發病之萬國士煙草為材料，依Hsu et al. [26]與陳等[7]之方法加以修改獲得部分萃取後濃縮之病毒純化物，再分別取1ml病毒懸浮液置入每管已事先經製備完成室溫八小時之10-40%蔗糖密度梯度離心管上層，以25000 rpm離心2小時 (Hitachi RPS40T rotor)，之後用針筒抽取白色病毒層，於4℃下以0.005M pH 7.5硼酸緩衝溶液透析。最後利用分光光度計 (Hitachi U-2001 spectrophotometer)測讀其波長320 nm至220 nm紫外光吸光值，並記錄吸光值最高之波長 (A_{max})/最低之波長 (A_{min})及波長260 nm (A_{260})/280 nm (A_{280})之比值，再依Cucumovirus之吸光係數 (extinction coefficient)＝1.7為定量標準[30]換算純化之病毒量。

抗血清製備：將1 ml純化之病毒 (1 mg/ml)加入等量之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant)充分乳化後，經皮下注射到紐西蘭白兔，之後分別再取1 ml純化之病毒 (1 mg/ml)加入等量之不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant)充分乳化，每隔7天追加注射一次，共計注射四次。第四次注射時將純化病毒含量增至2 mg/ml，所採之兔血在37℃恆溫水浴槽4小時，以5000 rpm離心15分鐘 (Hitachi R20A2 rotor)，蒐集上層透明略帶黃色之抗血清純化免疫球蛋白 (IgG)，使IgG的濃度為1 mg/ml後，冷凍保存於-20℃[2]。

血清學反應

利用SDS-免疫擴散反應取1g之田間薄葉牛皮消嵌纹病葉、SW-1病毒分離株煙草與萬國士煙草病葉、健康萬國士煙草，與水及3% SDS溶液以1：1：1的比例研磨，於100℃沸水加熱3分鐘，冰浴10分鐘，做為SDS處理抗原，並以農試所提供之感染CMV 編號046之甜椒葉片汁液做為正對照。

間接式酵素連結免疫吸附反應 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, Indirect ELISA)取薄葉牛皮消不同部位組織，加入4倍體積之coating buffer研磨，汁液加入ELISA反應盤 (100µl/well)中進行覆膜反應 (coating reaction)，並以源自SW-1分離株專一性抗體及農試所提供之CMV抗體進行檢測。檢測方法參考Koenig, R.[28]之步驟進行，使用稀釋6000倍之酵素結合免疫球蛋白 (enzyme-

linked goat anti-rabbit IgG)做為二次抗體來源。

病毒鞘蛋白分子量測定與西方轉漬分析

參照Laemmli之方法[29]，將純化病毒、感染SW-1分離株後發病之萬國士煙草、田間嵌紋狀薄葉牛皮消病葉、健康萬國士煙草及農試所感染CMV代號046甜椒病葉等樣品以1：1比例懸浮於LDS buffer，沸水加熱3分鐘後冰浴。電泳槽以150伏特通電90分鐘後取出膠體進行染色及褪染，並以標記蛋白比對結果估算病毒鞘蛋白分子量。另西方轉漬反應(Western blotting test)將純化病毒、感染SW-1分離株後發病之萬國士煙草與薄葉牛皮消田間病葉與農試所編號046 CMV正對照煙草病葉經SDS-PAGE電泳分離後，取下膠體，利用轉漬槽轉漬於PVDF纖維膜，以稀釋1000倍之自製抗血清、農試所CMV抗血清及10 ml TBST稀釋6000倍的山羊抗兔 (goat anti-rabbit)之第二抗體與之進行反應，最後利用AP kit (Bio-Rad AP substrate kit)，做為呈色基質進行呈色，終止反應後觀察反應結果[2]。

鞘蛋白基因之定序與分析

用商用RNA萃取試劑套組(QIAGEN, GmbH, Germany)，萃取植物全量RNA，以針對CMV病毒鞘蛋白核酸序列之引子對CMV-CPr (5'-AGT TTT GAG GTT CAA TTC CT-3') 及CMV-CPf (5'-ATT TCT CCA CGA CTG ACC AT-3')，直接進行one step RT-PCR (PROMEGA, Corporation, Madison, WI, USA) 反應。反應條件為先50℃，30分鐘；94℃，2分鐘 ，進行1個循環，後以94℃，45秒；60℃，60秒； 72℃，2分鐘，進行30個循環，最後以70℃，6分鐘，進行1個循環。增幅產物置於水平電泳膠 (1.5% agarose) 中，另以1.6 μl 100bp Marker做為標記，再使用溴化乙錠 (ethidium bromide)染色30秒，並利用大腸桿菌選殖系統套組 (pGEM-T Vector Cloning Kit)進行黏合反應，再以完成pGEM 黏合反應之液體加入大腸桿菌 (competent cell)中進行轉型，經選出之白色菌落培養後之菌液，進行PCR反應，確認插入片段無誤，篩選出之選殖株 (colony)，送明欣生物技術公司以ABI PRISM 377-96 DNA序列分析儀 (ABI, CA, USA)進行鞘蛋白基因之核苷酸解序，序列以DNA star進行分析，並轉譯為胺基酸序，解序後序列與NCBI (www.ncbi.Nlm.nih.gov)網站上之已知序列比對，分析不同病毒間之核苷酸序列和胺基酸序列的差異性，並進一步計算出彼此相似度。

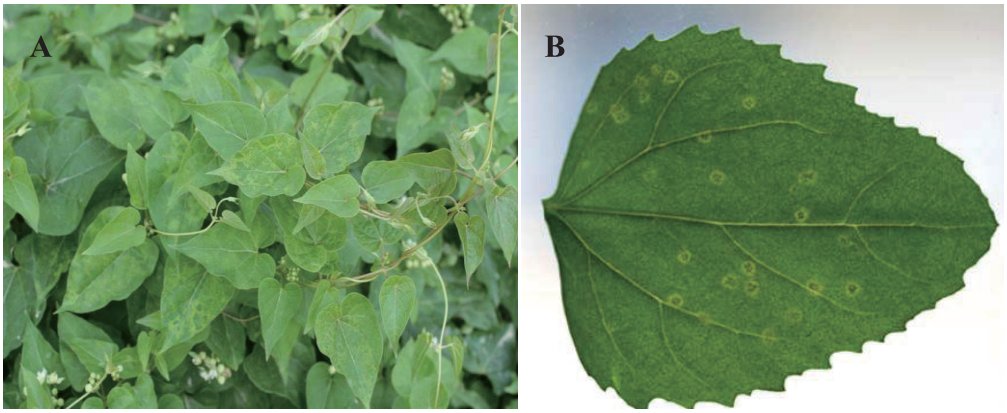
結　果

田間病害發生調查

自2006年5月至2008年4月共二年，每月定期調查高雄縣內門鄉地區之薄葉牛皮消，結果發現內門鄉薄葉牛皮消葉片幾乎皆具嵌紋病徵，且幼苗即有。經選一樣區以完全逢機設計 (CRD)調查20株牛皮消植株，共計調查100株，求平均值計算其罹病率 (%)，結果發現平均帶毒率達88%。

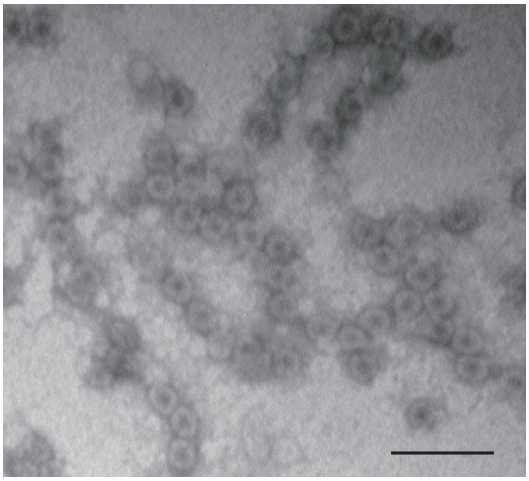
薄葉牛皮消病徵變化與生體內病毒分佈調查

本病害於苗期葉片上即有嵌紋狀病徵，病徵輕微之植株，其新葉發病較慢，常至第三對完全展開葉始出現嵌紋病徵，而發病較嚴重之植株，則新葉展開後即有嵌紋病徵 (圖一)且病徵明顯與否會受溫度影響而具相關性 (圖三)。配合每月紅藜接種分離情形，嵌紋病徵葉片每月皆可成功分離到病毒，另利用Indirect ELISA檢測病毒在植株上之分布情形，發現不僅嵌紋狀病徵葉片有病毒被檢出，其餘未顯現病徵之新葉、莖、塊根亦有病毒被檢測出 (表一)。



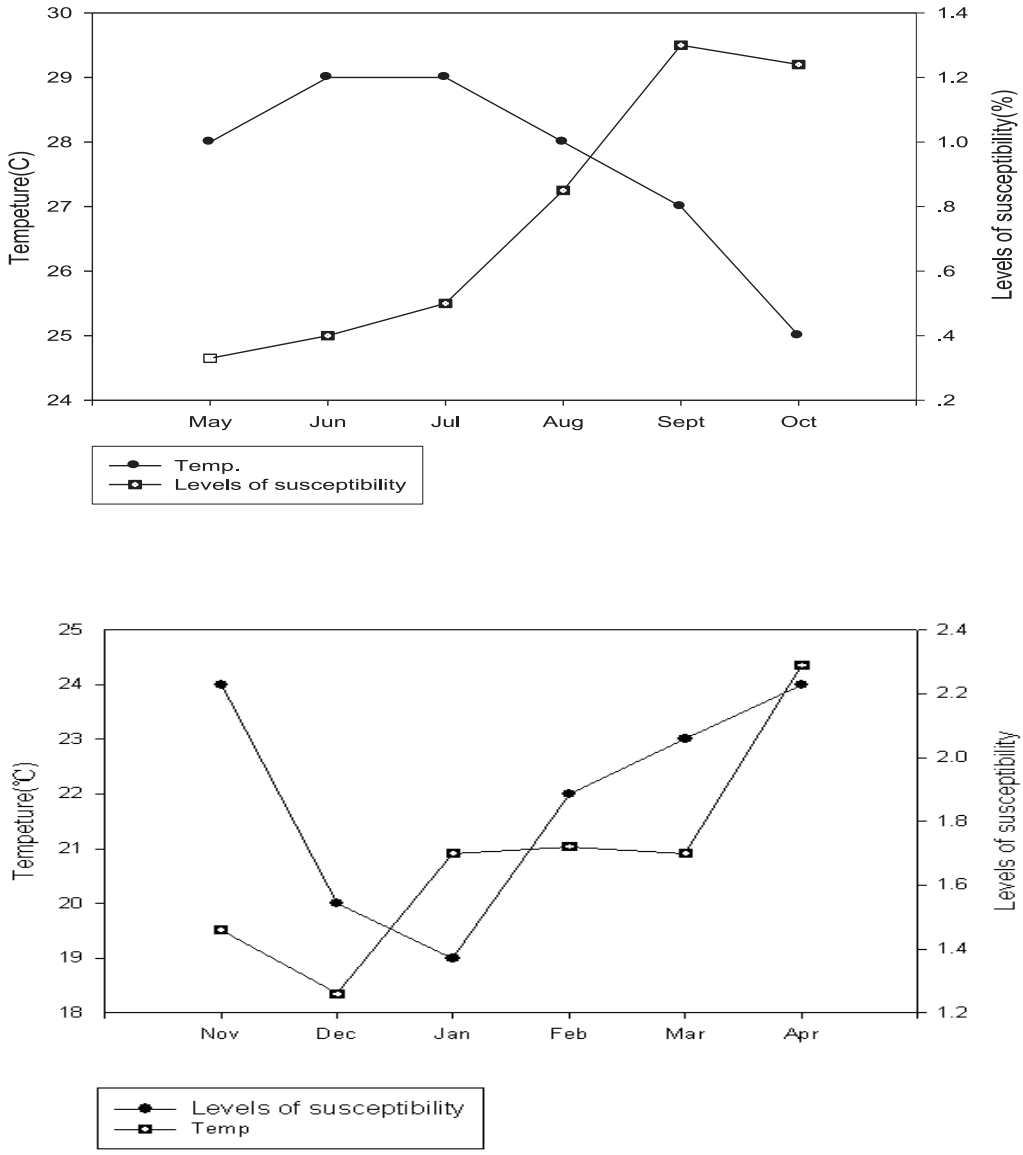
圖一、薄葉牛皮消葉片病徵(A)田間嵌紋病徵(B)紅藜機械接種田間薄葉牛皮消嵌紋病分離之SW-1病毒呈現局部性壞疽斑。

Fig. 1. Symptom induced by SW-1 on the leaves of Taiwan swallowwort(A)Mosaic symptoms in the field. (B)The local lesion symptom of virus isolate on *Chenopdium amaranticolor* isolated from Taiwan swallowwort leaf mosaic showing symptom.



圖二、薄葉牛皮消之SW-1分離株負染電顯圖。

Fig. 2. Electron micrographs of negatively Virus particles extracted from from Taiwan swallowwort showing mosaic symptom (Bar = 100nm).



圖三、2007至2008年薄葉牛皮消於不同季節病毒罹病級數表現。

Fig. 3. Disease severity index of virus disease of Taiwan swallowwort in different season during 2007-2008.

病毒之分離

取源自內門鄉種植於網室具有嵌紋病徵之薄葉牛皮消病株新葉，汁液經機械接種於紅藜葉片上，約3-4天後紅藜葉片出現局部壞疽斑點 (圖一)，利用紅藜經3次以上單斑分離即得一純系分離株，將其定名為SW-1。

寄主範圍測試

將SW-1病毒分離株機械接種於12科74種供試植物，結果發現蘿藦科、菊科、旋花科、藜科、葫蘆科、唇形科、茄科等7科34種會受感染，除藜科植物上為局部性病斑，其餘多為葉片呈現系統性嵌紋、葉脈黃化與幼葉畸形等病徵(表二)；所有病株回接紅藜皆會出現典型局部性壞疽斑。

病毒之體外物理性質測定

利用紅藜為生物檢定寄主分析SW-1分離株之各項生體外物理性質測定，結果顯示其熱不活化溫度為65℃，耐稀釋度為10-5 ，其感病汁液於室溫 (25℃)下能維持96小時，-80℃冷凍保存下感染活性可達14個月。

負染法電子顯微鏡觀察

取紅藜病葉之單斑，以穿透式電子顯徵鏡觀察，可見到一種球型病毒粒子，大小約28 nm，接種至煙草亦同。

蚜蟲媒介傳播測試

利用夾竹桃蚜進行非永續型媒介傳播試驗，在連續觀察四週後，三次蟲媒接種結果，於馬利筋葉片出現嵌紋病徵，取發病葉片以ELISA分析，均呈正反應，在電子顯微鏡下亦可觀查到直徑25nm之球形病毒粒子。

病毒純化與抗血清製備

以機械接種SW-1分離株發病之萬國士煙草嵌紋病葉為材料，依Hsu *et al.* [26]與陳[7]之方法加以修訂進行本病毒之純化，50克萬國士煙草病葉片，經系列步

表一、薄葉牛皮消植株上胡瓜嵌紋病毒分佈情形

Table 1. Distribution of Cucumber mosaic virus in Taiwan swallowwort plant.

part of Plant	Virus distribution[1)]
Root	＋
Stem	＋
Leaves(mosaic)	＋＋＋＋
Leaves(mosaic new leaf)	＋＋＋
Control[2)]	－

[1] The virus was detected by indirect ELISA.

－：negative reaction，A_{405}＜0.13

＋：Positive reaction，A_{405} =0.13-0.5；＋＋ ：A_{405}= 0.5-1；

＋＋＋： A_{405}= 1-1.5；＋＋＋＋；A_{405} =1.5-2.

[2] The healthy *Nicotiana tabacum* cv. *Hicks*

表二、由薄葉牛皮消嵌紋病分離之SW-1病毒分離株寄主植物反應

Table 2. Host range test of SW-1 isolate isolated from Taiwan swallowwort showing mosaic symptom by mechanical inoculation.

Test plants	Symptom[1]	EM[2]	Back inoculation[3]
Malvaceae錦葵科			
Abelmoschus esculentus L.Moench (黃秋葵)	−	−	−
Amaranthaceae莧科			
Amaranthus viridis (野莧)	−	−	−
Amaranthus spinosus (刺莧)	−	−	−
Celosia argentea (鷄冠花)	−	−	−
Gomphrena globosa (千日紅)	SM	+	+
Aristolochiaceae馬兜鈴科			
Aristolochia zollingeriana 港口馬兜鈴 (大花)	−	−	−
Asclepiadaceae蘿藦科			
Asclepias curassavica (馬利筋)	SM	+	+
Asclepias fruticosa (唐棉)	−	−	−
Asteraceae菊科			
Chrysanthemum coronarium (茼蒿)	SCL	+	+
Cichorium endivia (菊苣)	SM	+	+
Lactuca sativa 萵苣 (尖葉種)	SM	+	+
Helianthus argophyllus (向日葵)	−	−	−
Chenopodiaceae藜科			
Chenopodium amaranticolor (紅藜)	LL	+	+
Chenopodium murle (綠藜)	LL	+	+
Chenopodium quinoa (奎藜)	LL	+	+
Convolvulaceae旋花科			
Impatiens balsamina (鳳仙花)	−	−	−

Table 2. (Continued)

Test plants	Symptom[1]	EM[2]	Back inoculation[3]
Ipomoea reptans (蓯菜)	−	−	−
Ipomoea batatas (番薯)	−	−	−
Ipomoea nil (牽牛花)	SM	+	+
Cucurbitaceae 葫蘆科			
Benincasa hispida 冬瓜「農友細長」	SM	+	+
Cucumis melo 甜瓜「新玉」	SM	+	+
Cucumis melo (哈密瓜)	SM	+	+
Momordica charantiap (苦瓜)	−	−	−
Cucumis sativus 小胡瓜「農友544」	SM	+	+
Cucurbita pepo (南瓜)	−	−	−
Citrullus uulgaris 西瓜「富寶二號」	SM	+	+
Luffa aegyptiaca (絲瓜)	−	−	−
Leguminosae 豆科			
Glycine max (大豆)	−	−	−
Phaseolus vulgaris (四季豆)	−	−	−
Trifolium pratense (虎豆)	−	−	−
Vigna radiate (綠豆)	−	−	−
Vigna unguiculata 豇豆「白皮」	−	−	−
Lablab purpureus (鵲豆)	−	−	−
Cruciferae 十字花科			
Brassica botrytis (花椰菜)	−	−	−
Brassica campestris 油菜 (晚生種)	−	−	−
Brassica chinensis 白菜 「農友2號」	−	−	−
Brassica chinensis (青江菜)	−	−	−

Table 2. (Continued)

Test plants	Symptom[1]	EM[2]	Back inoculation[3]
Brassica juncea 芥菜(雪裡蕻)	−	−	−
Brassica oleracea 甘藍「夏光」	−	−	−
Brassica repea (蕪菁)	−	−	−
Capsella bursa-pastoris (薺菜)	−	−	−
Raphanus sativus (蘿蔔)	−	−	−
Labiatae 唇形花科			
Ocimum basilicum (九層塔)	SM	+	+
Melissa officinalis (香蜂草)	−	−	−
Poaceae 禾本科			
Zea mays (玉米)	−	−	−
Cynodon dactylon (百慕達草)	−	−	−
Solanaceae 茄科			
Capsicum annuum 甜椒「藍星」	SM	+	+
Datura metel 曼陀蘿	SM	+	+
Lycopersicon lycopersicum 番茄「農友301」	−	−	−
Lycopersicon lycopersicum 番茄「農友504」	−	−	−
Lycopersicon lycopersicum 番茄「農友933」	−	−	−
Nicotiana benthamiana	SM	+	+
Nicotiana debneyii	SM	+	+
Nicotiana glutinosa	SM	+	+
Nicotiana tabacum var. Havana	−	−	−
Nicotiana tabacum cv. Hicks (喜國士)	SM	+	+
Nicotiana tabacum var. kentuckey	SM	+	+
Nicotiana megalosiphon	SM	+	+

Table 2. (Continued)

Test plants	Symptom[1]	EM[2]	Back inoculation[3]
Nicotiana repanda	SM	+	+
Nicotiana rustica	−	−	−
Nicotiana tabacum var. Samsun	SM	+	+
Nicotiana tabacum cv.vam Hicks (萬國士)	SM	+	+
Nicotiana tabacum var.White burley	SM	+	+
Nicotiana tabacum var. Xxanthi	−	−	−
Solanum incanum (五指黃水茄)	SM	+	+
Solannum nigrum (龍葵)	SM	+	+
Solanum melongena (非洲紅茄)	SM	+	+
Solanum melongena (茄子「新娘」)	SM	+	+
Solanum melongena「屏東長茄」	SM	+	+
Solanum melongena (胭脂茄)	SM	+	+
Petunia hybrida (矮牽牛)	SM	+	+
Physalis fioridana (苦蘵)	−	−	−
Physalis ixocarpa (酸漿)	−	−	−
Gesneriaceae 苦苣苔科			
Sinningia speciosa (大岩桐)	SCL	+	+
Umbelliferae繖形花科			
Coriandrum sativum (芫荽)	−	−	−
Daucus carota (胡蘿蔔)	−	−	−

[1] SCL: Systemic cholrotic lesions；SM: Systemic mosaic LL：Local lesion；
−：no reaction

[2] +：isometric virus particles were evidenced by electron microscopy
.−：no virus particle were observed by electron microscopy

[3] +：successfully infecitng *Chenopodium amaranticolor*
.−：not successfully infecitng *Chenopodium amaranticolor*

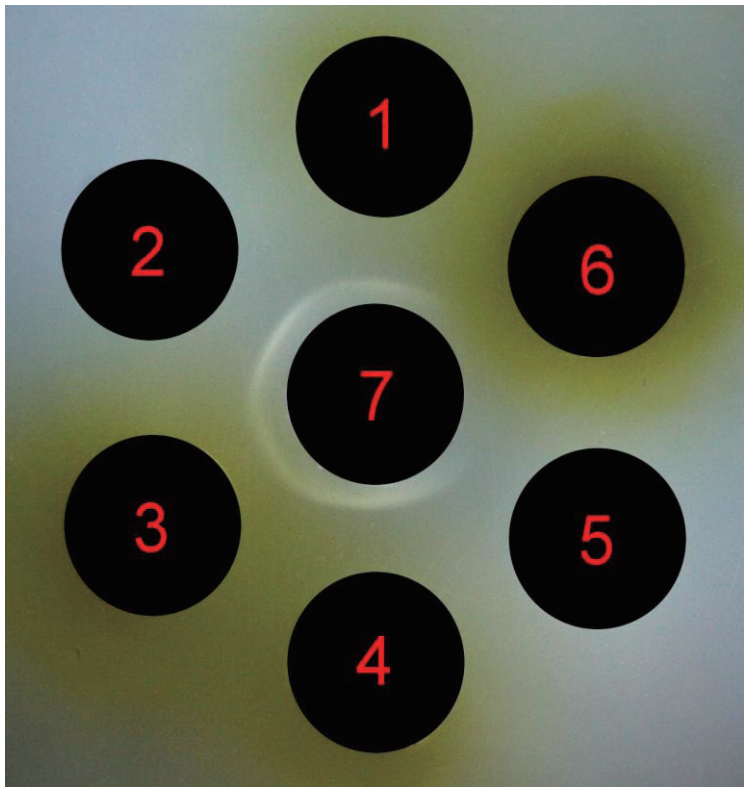
驟及蔗糖密度梯度離心純化後，於離心管距液面2 cm處可見一乳白色病毒帶，經電顯檢查乳白色病毒帶可見到大量球型病毒粒子 (圖三)，抽取環帶經4小時3次透析後，即得純化之病毒，以分光光度計 (Hitachi U-2001 spectrophotometer) 測其波長320 nm至220 nm紫外光吸收圖譜，顯示其為典型核蛋白，其A_{max} 在260 nm，A_{min}在240nm，A260/A280之比值為1.8，依Cucumovirus之吸光係數(extinction coefficient)＝1.7為定量標準，每50克萬國士煙草病葉所得純化病毒收量約為66.6 mg。

將上述純化病毒於紐西蘭免疫兔四次免疫注射後 7-10天部分採血所得抗血清，以界面環形沉澱法進行抗體力價測



圖四、分離自薄葉牛皮消球形病毒SW-1分離株抗血清與其對應同源抗原之瓊脂雙向擴散反應。(1)田間薄葉牛皮消病葉 (2) SW-1 分離株純化病毒 (3)田間薄葉牛皮消病葉 (4) SW-1分離株 (5)蒸餾水(6)健康萬國士煙草 (7)自製SW-1病毒分離株抗血清。

Fig. 4. The Serological reaction of the produced antiserum against SW-1 virus isolate reacted with the homologous antigen in double immunodiffusion . (1) The Taiwan swallowwort mosaic leaf. (2) The purified SW-1 virus. (3) The Taiwan swallowwort field mosaic leaf. (4) The Isolated SW-1. (5) Dist H_2O. (6) The Healthy *Nicotiana tabacum* cv.vam Hicks. (7) Antiserum to virus SW-1 isolate from Taiwan swallowwort.



圖五、農試所製備之胡瓜嵌紋病毒抗血清與其對應同源抗原之瓊脂雙向擴散反應。(1) 農試所 *cucumber mosaic virus* 正對照 (2) SW-1 分離株純化病毒 (3)田間薄葉牛皮消病葉 (4) SW-1分離株 (5)蒸餾水 (6) 健康萬國士煙草 (7)農試所046 *cucumber mosaic virus* 抗血清。

Fig. 5. The Serological reaction of the produced antiserum against CMV(ARI) reacted with the homologous antigen in double immunodiffusion. (1) The mosaic leaf on *Nicotiana benthamiana* NO.046 CMV control(ARI). (2) The purified SW-1 virus. (3) The Taiwan swallowwort field mosaic leaf. (4) The Isolated SW-1. (5) Dist H_2O. (6) The Healthy *Nicotiana tabacum* cv.vam Hicks. (7) No.046 CMV antiserum to CMV (ARI).

試，結果顯示抗體力價可達2048倍。

血清學反應

進行瓊脂雙向擴散反應結果分別顯示，自製抗血清與田間薄葉牛皮消嵌紋葉片、SW-1分離株煙草與純化物抗原，皆呈現同源正反應；健康煙草及蒸餾水則無反應 (圖四)；另由農試所提供代號046抗血清與感染CMV病毒之甜椒葉片正對照及由高師大王惠亮博士提供矮牽牛CMV抗血清及感染CMV之*Nicotiana benthamiana*煙草正對照病葉與上述樣

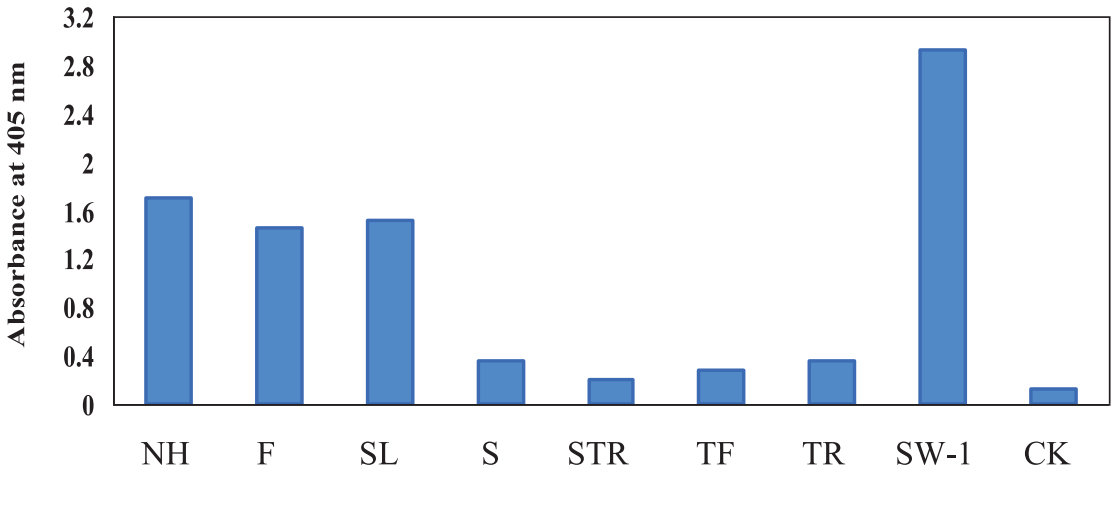


圖六、高師大製備之胡瓜嵌紋病毒抗血清與其對應同源抗原之瓊脂雙擴散反應。(1) SW-1 分離株純化病毒 (2) 健康萬國士煙草 (3) 田間薄葉牛皮消病葉 (4) SW-1 分離株 (5) 蒸餾水 (6) 高師大CMV正對照 (7) 高師大 CMV 抗血清。

Fig. 6. The Serological reaction of the produced antiserum against CMV(NKNU) reacted with the homologous antigen in double immunodiffusion. (1) The purified SW-1 virus. (2) The Healthy *Nicotiana tabacum* cv.vam Hicks. (3) The Taiwan swallowwort field mosaic leaf. (4) The Isolated SW-1 (5) Dist H_2O. (6) The mosaic leaf on *Petunia liybrida* CMV control(NKNU). (7) CMV antiserum to CMV (NKNU).

品反應，亦會發生明顯特異性沉澱反應 (圖五、六)；而以*Tomato aspermy virus*(TAV)抗血清與上述樣品反應，則無並無任何沉澱反應。

將植物汁液稀釋至5倍與免疫球蛋白濃度2μg/ml時，罹病煙草植物的A_{405} 讀值可達1.7，約為健康煙草的10倍，此為較佳反應效果，依上述試驗所得ELISA最佳反應條件，針對高雄縣內門鄉、鳳試所田間具嵌紋與無病徵之牛皮消葉片進行病毒檢測，結果顯示各田間牛皮消嵌紋病葉中皆可有效檢出病毒且各種樣品中所含的病毒量差異不大 (圖七)，而無病徵葉片亦可檢出病毒，莖及地下



圖七、利用間接式酵素連結免疫吸附法檢測田間薄葉牛皮消病株。

Fig. 7. Enzyme-linked immounosorbent assay of plant extracts prepared from the diseased Taiwan swallowwort .(NH: net house at Fengshan; F: field at Neimen in Kaohsiung; SL: symptomless leaf; S: stolon; STR: skin of tuberous root; TF:tuberous flesh; TR: tuberous root(whole); SW-1: SW-1 isolate: CK: healthy tobacco).

塊根含毒量極低。另以*Tomato aspermy virus* (TAV)及農業試驗所製備編號046之CMV兩種病毒抗血清進行Indirect ELISA反應，結果僅CMV抗血清會出現正反應。

利用純化病毒懸浮液、發病萬國士煙草與田間樣品經SDS-PAGE後，利用轉漬器轉漬於PAVF膜上，再分別以自製抗血清及農試所所製備編號O46 胡瓜嵌紋病毒抗血清作用，並以AP substrate kit進行呈色，結果顯示純化病毒懸浮液、發病萬國士煙草與田間嵌紋葉樣品，皆可與上述兩種抗血清發生明顯之正反應，呈現紫色反應條帶。

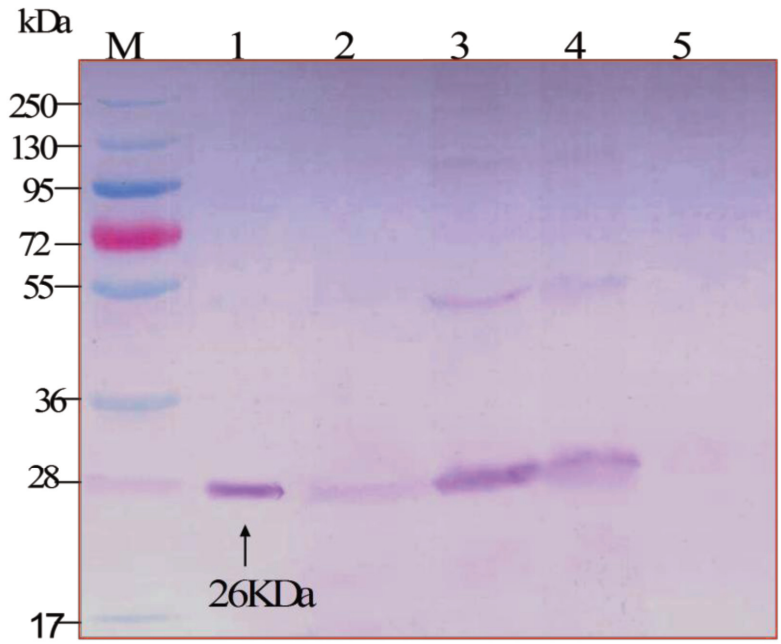
病毒鞘蛋白分子量測定

純化之病毒經西方轉漬分析病毒鞘蛋白與標記蛋白做比對，估算得知病毒鞘蛋白分子量約為26 kDa (圖八)。

鞘蛋白基因之定序與分析

(一)反轉錄聚合酵素連鎖反應 (one step RT-PCR)

應用one step RT-PCR (PROMEGA, Corporation, Madison, WI, USA)進行偵測SW-1分離株病毒其鞘蛋白基因，取感染薄葉牛皮消SW-1分離株萬國士煙草病葉，薄葉牛皮消田間嵌紋病葉、健康奎藜葉片及健康*Nicotiana benthamiana*



圖八、應用西方轉漬法以農試所代號046 CMV抗血清與純化薄葉牛皮消病毒株反應之鞘蛋白分子量(M)標記蛋白（1）SW-1純化病毒(2)田間薄葉牛皮消病葉 (3)SW-1分離株 (4)農試所代號046 CMV 正對照 (5)健康萬國士煙草。

Fig. 8. The determination of molecular weight of viral coat proteins of purified Taiwan swallowwort mosaic virus by western blotting analysis used No.046 antiserum to *Cucumber mosaic virus*. Lane M , protein Markers; lane 1, the purified SW-1 virus; lane 2, the Taiwan swallowwort field mosaic leaf ;lane 3,the Isolated SW-1; lane 4,No. 046CMV (ARI) control; lane 5,the Healthy *Nicotiana tabacum* cv.vam Hicks.

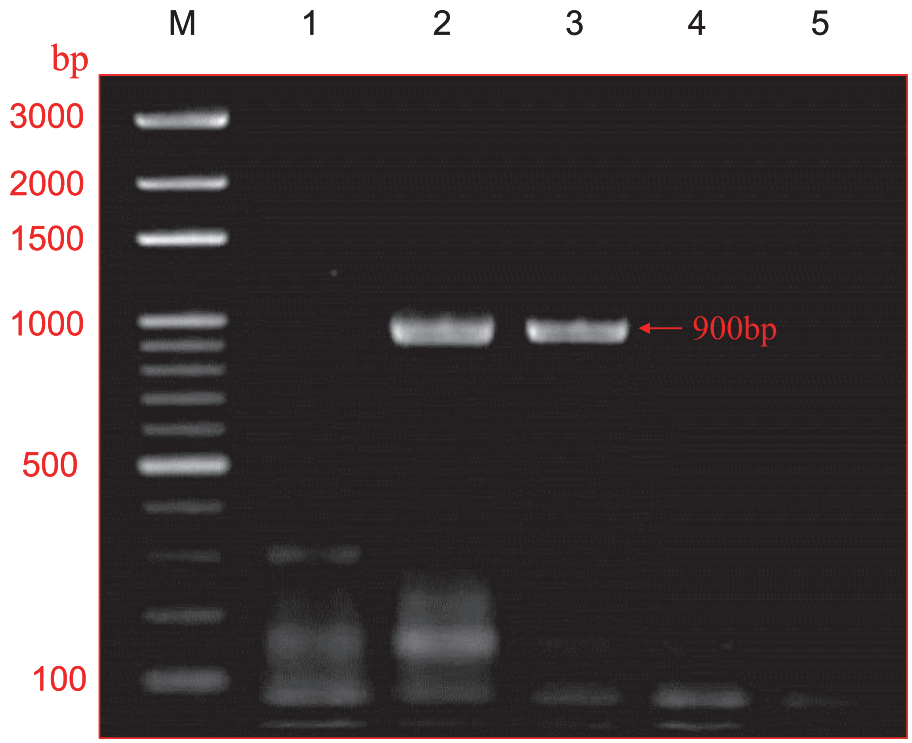
煙草，以CMV病毒之鞘蛋白引子對CMV-CPr、CMV-CPf進行one step RT-PCR反應，結果除健康奎藜與健康煙草外，其餘皆可增幅出一約900bp之核酸產物 (圖九)。

(二)鞘蛋白基因核苷酸序列之解讀

選殖本病毒鞘蛋白基因片段，經解序後共得889個核苷酸(nucleotide, nt)，經轉譯後得218個胺基酸 (圖十)。胺基酸序列經分析比對之後證實符合Cucumovirus屬病毒之特性。

(三)鞘蛋白基因核苷酸序列之分析

本研究之SW-1分離株病毒2-1選殖株，經由鞘蛋白基因核苷酸序列解序後，與NCBI網站上之國內外報告不同品系CMV中已登錄於GenBank之前16個親緣關係較近之CMV品系進行鞘蛋白序列比對，發現其核苷酸序列與來自台灣分離自番茄 (accession number D28780)的胡瓜嵌紋病毒NT9系統與來自義大利



圖九、利用CMV鞘蛋白引子對進行one step RT-PCR分析，增幅出900 bp 之DNA產物：(M) 標準DNA標記 (1) 健康煙草 (2) 感染SW-1分離株之煙草病葉 (3) 薄葉牛皮消田間病葉 (4) 健康奎藜 (5) 負對照。

Fig. 9. One step RT-PCR using a pair of CMV-CP primer was conducted and a 900 bp DNA produce was amplified.result. The samples from left to right. Lane M, DNA markers ; lane 1, the Healthy *Nicotiana tabacum* cv.vam Hicks; lane 2, the mosaic leaf on *Nicotiana tabacum* cv.vam Hicks ; lane 3 ,the Taiwan swallowwort mosaic virus leaf ; lane 4, Health *C. quinoa*; lane 5, negative control.

蕃茄所分離之的Tfn系統 (accession number Y10886)有99%之相同度為最高，胺基酸序列則與 CMV Tfn、113 (accession number AF523340)系統有100%之相同度 (表三)。

討 論

2003年在高雄縣內門鄉發現薄葉牛皮消葉片上呈現嵌紋病徵，至2005年有趨嚴重現象，經本研究室採集田間病葉，於電顯下觀察，初步鑑定薄葉牛皮消為球形病毒所感染，機械接種紅藜及奎藜，均於3~4天即出現明顯局部壞疽病斑；將田間病葉、紅藜壞疽病斑，以

```
 M  D  K  S  E  S  T  S  A  G  R  N  R  R  R  R  P  R  R  G
ATGGACAAATCTGAATCAACCAGTGCTGGTCGTAACCGTCGACGTCGTCCGCGTCGTGGT        60
 S  R  S  A  P  S  S  A  D  A  N  F  R  V  L  S  Q  Q  L  S
TCCCGCTCCGCTCCCTCCTCCGCGGATGCTAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAACTTTCG        120
 R  L  N  K  T  L  A  A  G  R  P  T  I  N  H  P  T  F  V  G
CGACTTAACAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGTGGGT        180
 S  E  R  C  K  P  G  Y  T  F  T  S  I  T  L  K  P  P  K  I
AGTGAACGCTGTAAACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTGAAGCCGCCGAAAATA        240
 D  R  G  S  Y  Y  G  K  R  L  L  L  P  D  S  V  T  E  F  D
GACCGCGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTGCTACCTGATTCAGTCACGGAGTTCGAT        300
 K  K  L  V  S  R  I  Q  I  R  V  N  P  L  P  K  F  D  S  T
AAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACC        360
 V  W  V  T  V  R  K  V  P  A  S  S  D  L  S  V  A  A  I  S
GTGTGGGTGACAGTCCGTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCTATCTCT        420
 A  M  F  A  D  G  A  S  P  V  L  V  Y  Q  Y  A  A  S  G  V
GCTATGTTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGGCGTT        480
 Q  A  N  N  K  L  L  Y  D  L  S  A  M  R  A  D  I  G  D  M
CAAGCCAACAACAAATTGTTGTACGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGATATTGGCGACATG        540
 R  K  Y  A  V  L  V  Y  S  K  D  D  A  L  E  T  D  E  L  V
AGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGATGCGCTCGAGACGGACGAGTTGGTA        600
 L  H  V  D  I  E  H  Q  R  I  P  T  S  G  V  L  P  V*        218
CTTCATGTTGACATCGAGCACCAACGCATTCCCACATCTGGGGTGCTCCCAGTTTGAATC        660
CGTGTTTTCCCAGAATCCTCCCTCCGGTCCTGTGGCGGGAGCTGAGTTGGTAGTGTTGCT        720
ATAAACTACCTGAAGTCACTAAACGCTTTGCGGTGAACGGGTTGTCCATCCAGCTTACGG        780
CTAAAATGGTCAGTCCGTGGAGAAATAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGA        840
GCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATACAATC A                  889
```

圖十、 2-1選殖株基因組之鞘蛋白核苷酸及其轉譯之胺基酸序列。

Fig. 10. The nucleotides sequences and deduced amino acids sequences of the cloned region of 2-1 from SW-1 virus isolate of Taiwan swallowwort.

表三、從薄葉牛皮消分離之SW-1分離株之2-1選殖株之鞘蛋白基因與已發表之CMV序列比對

Table 3. Comparison of nucleotide and amino acid sequences identities of the coat protein gene of SW-1 virus isolate obtained from Taiwan swallowort with other *Cucumber mosaic virus* isolates available in GenBank.

Virus isolate	Accession NO.	Source	Host	Identity	
				nt (%)	aa (%)
CMV (Tfn)	Y10886	Italy	tomato	99	100
CMV(NT9)	D28780	Taiwan	tomato-	99	99
CMV VAL90/1	AJ829779	Spain	tomato	99	99
CMV（Tfn）	Y16926	Italy	tomato	98	100
CMV BAR92/1	AJ829778	Spain	tomato	99	99
CMV VAL90	AJ829779	Spain	tomato	99	99
CMV 113	AF523340	USA	tomato	98	100
CMV	AM183116	Spain	tomato	97	98
CMV(cb7)	EF216867	China	tomato	97	98
CMV YN	EF216865	China	Makino	97	98
CMV JF	DQ302720	Chian	tomato	97	99
CMV SF	DQ302721	Chain	tomato	96	98
CMV BF	DQ302714	Chain	tomato	96	98
CMV SD	AB008777	Chain	—	94	99
CMV 42CM	AB368498	Japan	—	94	98
CMV	AB119091	Japan	—	94	98

* - :no information available.

CMV及TAV抗血清進行瓊脂雙向免疫擴散反應，均與胡瓜嵌紋病毒抗血清有正反應，初步推論可能與*Cucumovirus*屬病毒相關。

依據台灣植物病害名彙(2002)，目前台灣尚無薄葉牛皮消病毒病害之記錄，國外報導於Plant Viruses Online網頁資訊中提到由 Cohen and Harpaz於1964年發表文獻中，牛皮消(*Cynanchum acutum*)為番茄黃化捲葉病毒 (TYLCV)[19]之自然寄主，但經查閱此文獻，並無提到有關*Cynanchum acutum*之任何內容，僅介紹TYLCV病毒與媒介昆蟲之間的關係關。Savino and Gallitelli於1976年研究報告中薄葉牛皮消有lucerne mosaic virus[32]的感染。

田間病徵調查主要以內門鄉及鳳山鳳試所網室為調查區，以目視法觀察葉片上之嵌紋病徵，結果顯示內門鄉平均帶毒率為88%，鳳試所亦有83%之帶毒率，顯示此病害在田間發生很普遍，此並與薄葉牛皮消以地下塊根無性繁殖的栽培方式有密切關係。目前內門鄉之薄葉牛皮消栽培僅有每年10月～隔年4月的秋作，緣因薄葉牛皮消較適合低溫氣候及排水良好之環境，夏季高溫多雨，田間植株死亡率高，且地下塊根收量極少，基於此，由內門鄉取回薄葉牛皮消種薯於鳳試所行網室栽培，避開颱風、雨水問題以瞭解全年本病毒於薄葉牛皮消上之罹病與溫度之間關係，結果顯示病害程度與溫度成負相關，5月～10月栽培之夏作，平均溫度為25℃～29℃，罹病級數0.3～1.4級，而秋作19℃～24℃，罹病級數則較高1.4～2.5，另外分析罹病率與產量之關係，顯示夏季植株罹病率56%，每株平均產量僅26.78g；而秋作罹病率88%，每株平均產量164.09 g達到夏作的6倍，顯示冷涼氣溫較適於發展本病毒且隨寄主植物生長良好情形下發病較為嚴重，但尚未嚴重影響植株產量。

本研究中由薄葉牛皮消分離之SW-1病毒分離株經電顯觀察，其病毒粒子大小約為28 nm，其熱不活化溫度為65℃，耐稀釋度為10^{-5}，於25℃室溫及-80℃冷凍保存活性試驗中，分別可維持96小時及12個月以上，這些物理性質與胡瓜嵌紋病毒極為相似[11,13,14]。

本報告分離自薄葉牛皮消之SW-1病毒，其寄主範圍測定結果，會感染蘿藦科、菊科、旋花科、藜科、葫蘆科、唇形科、茄科等7科34種植物，在紅藜及其它藜科植物皆出現局部壞疽病徵，其餘均為系統性病徵，尤其是，與薄葉牛皮消同為蘿藦科之馬利筋亦可被機械接種感染呈現葉脈透化之嵌紋病徵，在國內有關胡瓜嵌紋病毒之文獻中，寄主範圍測試，尚無馬利筋為胡瓜嵌紋病毒寄主之報導[5,6,7,11,13,15,16]。以SW1分離株接種於74種供試植物結果顯示與TN9分離株[27]在奎藜上皆產生局部病斑，在大部分瓜類及煙草上有相同之系統性病徵，若依小室康雄[17]利用胡瓜嵌紋病毒在各科植物上之反應以區分胡瓜嵌紋病毒品系之歸類方式，本研究之SW-1分離株會造成寄主葉脈透化嵌紋病徵之現象，SW-1應不屬豆科系統，亦不屬於十字花科系統，而屬普通系統群。

媒介昆蟲傳播試驗以馬利筋為蟲

傳寄主植物，因田間薄葉牛皮消上蟲害調查有夾竹桃蚜棲群，但無健康薄葉牛皮消可做供試植物，若依王[1]於1981年發表之文獻中，提到夾竹桃蚜為以非持續型方式傳播木瓜輪點病之蚜蟲種類之一，而學者Hobbs[25]提到夾竹桃蚜 (*Aphis nerii*)可傳播胡瓜嵌紋病毒，且寄主之一為馬利筋，故本研究以馬利筋為蟲傳供試植物，並以自製SW-1分離株抗血清依Indirect ELISA確認蟲媒傳毒效果，結果顯示SW-1分離株確實可經由夾竹桃蚜以非持續型方式成功媒介傳播。

血清學試驗中，以Indirect ELISA檢測田間薄葉牛皮消病株，無嵌紋狀葉亦可檢測出病毒，顯示薄葉牛皮消植株外表雖無呈現感病病徵，仍具有潛伏之病毒存在，另外為瞭解種薯帶毒情形，將種薯分為薯皮、薯肉及完整薯塊，於相同稀釋倍數之下，ELISA檢測結果顯示，其薯皮讀值為0.197，薯肉為0.273，完整種薯為0.32 (對照健葉煙草讀值為0.126)，是否顯示種薯含毒量極低，尚待於往後繼續研究。另針對鳳試所網室調查罹病級數與溫度相關之結果，分別以ELISA檢測夏作及秋作薄葉牛皮消嵌紋病葉，結果顯示夏作嵌紋病葉ELISA讀值為0.7，秋作為1.7-2.4，此與本研究病害程度與溫度呈負相關之調查結果相同。

在*Cucumovirus*屬中有*Tomato aspermy virus*, *Peanut stunt virus*, *Cucumber mosaic virus,*, *Gayfeather mild mottle virus*等四種，病毒粒子外形及感染途徑相似且親緣相近[20]。本研究為瞭解SW-1分離株之血清關係，除自製SW-1抗血清之外，另有以農試所提供之代號046 CMV抗血清及煙草分離株TAV抗血清、高師大王惠亮博士提供之矮牽牛分離株胡瓜嵌紋病毒抗血清，利用瓊脂免疫雙向擴散法(SDS)測試其親緣反應，結果發現由薄葉牛皮消分離之SW-1病毒，無論是純化、煙草病葉與田間病葉，僅與胡瓜嵌紋病毒抗血清發生沉澱反應，不與TAV抗血清有相互反應，這與Grogen (1963) [23]之報告其以瓊脂雙向擴散反應試驗證實TAV與胡瓜嵌紋病毒在血清學上並不會發生相互反應之結果相同，而另一種同為*Cucumovirus*屬之PSV則因缺抗血清而另待後續分子生物學試驗結果反證之。又利用平板凝膠電泳SDS-PAGE及西方轉漬法 (Western blotting)分析SW-1分離株病毒鞘蛋白分子量，結果約為26KDa，此正符合CMV鞘蛋白分子量24-26.3KDa範圍[21]，由上述血清學試驗結果，更進一步確認所分離之病毒為CMV的可能性。

除傳統病毒生物性質比較外，利用病毒間基因組鞘蛋白基因特定片段之核苷酸與胺基酸之序列相同度比對，可專一性正確鑑定胡瓜嵌紋病毒之品系，為分類上增添有力的鑑別指標。據Roossinck等人 (1999)[31]分析CMV RNA3的5' 端非轉譯區與鞘蛋白序列，將胡瓜嵌紋病毒分為IA、IB及Ⅱ三亞群，因此依據序列親緣關係比對的結果，本研究之薄葉牛皮消SW-1病毒分離株鞘蛋白選殖後解出之序列，經與NCBI GeneBank已知序列比對，與台灣胡瓜嵌紋病毒之NT9 (D28780)、義大利Tfn分離株(Y10886)在鞘蛋白上皆有99%以上的相

同度，而胺基酸序列與CMV Tfn有100%的相同度，另與賴之胡瓜嵌紋病[16]美人蕉分離株鞘蛋白基因序列比對，核苷酸相同度為94%，胺基酸相同度達98%，根據Chen *et al* [18]、Roossinck *et al* 及Gallitelli [22]研究之報告，NT9及Tfn皆為IB系統，而賴的報導中亦推論其分離株應為IB系統，依上述比對資料顯示，故本研究之SW-1分離株推論亦應為胡瓜嵌紋病毒IB系統。

薄葉牛皮消田間發病嚴重且苗期即有病徵，且無論田間或網室人工栽培植株皆不產種子，使本研究無法依柯霍氏法則利用健康植株回接病毒，但仍可由上述如病毒形態大小、基本物理特性、血清學反應、及鞘蛋白分子生物學比對等諸多證據，顯示本研究中由田間具嵌紋病徵之薄葉牛皮消所分離出之SW-1病毒分離株確為胡瓜嵌紋病毒，此為在台灣首次由薄葉牛皮消分離出之病毒新記錄。

參考文獻

1. 王惠亮。1981。台灣木瓜輪點病之蚜蟲媒介研究。植保會刊23 : 229-233。
2. 林宜螢。2003。由茉莉花分離之一種新*potyvirus*之特性研究。屏東科技大學植物保護系碩士論文。屏東。97頁。
3. 曾郁敏、顧立剛、王玥琦、龔樹生。2000。白首烏誘導腫瘤細胞凋亡的實驗研究。中國中醫藥訊息 7 : 25-26。
4. 張如松、葉益萍、沈月毛、梁惠玲。2000。白首烏體外抑制腫瘤細胞的成分研究。醫藥學報 35 : 431-437。
5. 陳金枝、張清安、林玫珠、方懷聖。2000。胡瓜嵌紋病毒感染引起的港口馬兜鈴嵌紋病之鑑定。植病會刊 9 : 29-34。
6. 陳煜焜、陳慶忠、柯文華、陳脉紀。1995。 千鳥草上胡瓜嵌紋病毒之分離與鑑定。植保會刊 37 : 319-330。
7. 陳慶忠、柯文華、陳煜焜。1998。洋桔梗上胡瓜嵌紋病毒之鑑定及傳播試驗。台中區農業改良場研究彙報 60 : 1-18。
8. 顧立剛、鄭嘉、陳蕾、祝捷、王月琦、龔樹生。白首烏體外對小鼠T淋巴細胞功能影響的研究。中國中醫藥訊息8 : 34-35。
9. 楊遠波、劉和義、彭鏡毅、施炳霖、呂勝由。1998。台灣維管束植物簡誌第肆卷。行政院農業委員會印。台北。431頁。
10. 蔡孟君、廖俊旺、曾勝雄、全中和、吳聲舜、楊淑惠、王順成、黃振聲。2005。山蘇葉等加工農產食品之安全性評估。植保會刊47 : 403-418。
11. 廖吉彥、盧耀村。2000。台灣菠菜黃化嵌紋病毒1.胡瓜嵌紋病毒分離鑑定。植病會刊 94 : 167-176。
12. 鄭武燦。2000。台灣植物圖鑑（下）。茂昌圖書有限公司。台北。1100頁。
13. 鄭德源、盧耀村。1977。台灣西瓜嵌

紋病及胡瓜嵌紋病病原毒素之分離與鑑定。植保會刊 19：296-299。

14. 劉業經、歐辰雄、呂福原。1988。臺灣樹木誌。國立中興大學農學院出版委員會。台中。809頁。
15. 盧幽枝。2005。矮牽牛分離之胡瓜嵌紋病毒特性之研究。國立高雄師範大學生物科學研究所碩士論文。高雄。69頁。
16. 賴奎漙。2006。台灣美人蕉病毒病害及由其分離之胡瓜嵌紋病毒特性研究。國立屏東科技大學碩士論文。屏東。94頁。
17. 小室康雄。1967。キェゥリのぇろ斑點症狀株ずょび奇形果かゥ分離されゐゥィルス。植物防疫 21 : 11-14。
18. Chen,Y. K., Derks, A. F. L. M., Langeveld, S. A., Goldbach, R., and Prins, M. 2001. High sequence conservation among Cucumber mosaic virus isolates from Lily. Arch. Virol. 146 : 1631-1636.
19. Cohen, S., and Harpaz, I. 1964. Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly. Ent. Exp. appl 7: 155-166.
20. Dever, J., and Cardin, L. 1975. Relation serologiques Cucumovirus（CMV,TAV,PSV）. Ann. Phytopathol. 7 : 255-276.
21. Francki, R. I. B. 1980. Cucumber mosaic *cucumovirus*. Plant Viruses Online.
22. Gallitelli, D. 2000. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture in Italy. Virus Res. 71: 9-12pp.
23. Grogan, R. G., Uyemoto, J. K., and Kimble, K. A. 1963. Evidence that tomato aspermy and cucumber mosaic viruses are serologically unrelated. Virol. 21: 36-42.
24. Harper, G., Hart, D., Moult, S., and Hull, R. 2004. Banana streak virus is very diverse in Uganda. Virus Res. 100 : 51-56.
25. Hobbs, H. A., Eastburn, D. M., and D’ Arcy, C. J. 2000. Solanaceou seeds as Possible Sources of *Cucumber mosaic virus* in Southern Illinois for Aphid Transmission to Pepper. Plant Dis. 84 : 1221-1222.
26. Hsu, Y. H., Wu, C. W., Lin, B.Y., Chen, H. Y., Lee, M. F., and Tsai, C. H. 1995. Complete genomic RNA sequences of *Cucumber mosaic virus* strain NT9 from Taiwan. Arch. Virol. 140 : 1841-1847.
27. Hsu, Y. H., F. Z. Lin, C.C.Hu and S. C. Yin. Host reaction, serology and RNA pattern of cucumber mosaic virus isolates. Plant Prot. Bull. 31:551-59
28. Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity

detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55 : 53-62.

29. Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of T4. Nature 227 : 680-685.
30. Nameyh, S. 2002. Virus disease of petunia. Greenhouse Product News. 12 : 24-28.
31. Roossinck, M. J., Zhang, L., and Hellwald, K. H. 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogentic analyses of *cucumber mosaic virus* RNA3 indicate radial evolution of three subgroup. J. Virol. 73: 6752-6758.
32. Savino, V., and Gallitelli, D. 1976. Cynanchum acutum L., a new natural host of lucerne mosaic virus. Phytopathol. Mediterr. 15 : 63-64
33. Sophorn, S. 1999. Evaluation of determinate tomato inbred lines for multiple disease resistance. Asian Vegetable Research and Development Certer（AVRDC）, Shanhun, Tainan, Taiwan.5pp.

ABSTRACT

Yang , S. H. [2], Chen, T. H. [1*], Tzeng, J. [1], Lee, W.L. [2], Tsao, L.Y. [2], Chen, C.C. [3] .2014. Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolated from Taiwan swallowwort (*Cynanchum taiwanianum* Yamazaki) in Taiwan. Plant Prot. Bull. 56(4): 109-136. ([1] Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Neipu 91201, Taiwan, R.O.C.; [2] Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Fengshan, Kaohsiung, Taiwan, R.O.C. [3] Plant Pathology Division of Taiwan Agricultural Research Institute, COA, Wufeng, Taichung 41362, Taiwan, R. O. C.)

Taiwan swallowwort (*Cynanchum taiwanianum* Yamazaki) is a native herbal plant in Taiwan. It belongs to Asclepiadaceae and has economically cultivated at Neimen Township, Kaohsiung County, Taiwan, due to its tuber is used as herbal medicine. Taiwan swallowwort virus disease was first found at Neimen area in 2005. Isometric particles were observed in diseased leaves showing mosaic symptom by electron microscopy. A disease incidence of 88% was obtained in field survey at Neimen area. However, a fluctuation in disease symptoms relative to temperature could be observed at net house cultivation. An apparently disease symptom appeared during the low temperature period from January to April. While, mild disease symptoms were observed during high temperature period from May to August. An isometric viral particle of 28 nm in diameter was successfully isolated by mechanical inoculation from a diseased Taiwan swallowwort plant showing mosaic symptom to *Chenopodium amaranticolor* and named as SW-1. The thermal inactivation point of SW-1 and the dilution end point was 10^{-5}. The longevity in vitro of SW-1 was 96 hours at 24℃and more then 12 months at -80℃. A purified viral preparation of 66.6 mg could be obtained from 50g SW-1 infected leaf tissue of *Nicotiana tabacum cv. vam* Hicks. The host range tests indicated that SW-1 could infect 32 plant species in 7 families such as Cucurbitaceae、Chenopodiaceae、Solanaceae and etc. among 74 plant species in 12 families inoculated mechanically. The molecular weight of coat protein of the virus was estimated at 26 KDa by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate

* Corresponding author. E-mail: thchen@mail.npust.edu.tw

(SDS) polyacrylamide gel. An antiserum with a titer of 2048 was obtained by immunizing a New Zealand white rabbit with the purified virions. In Western blotting, indirect enzyme-linked immunosorbent assay and SDS-agar gel double diffusion test, the antiserum against reacted strongly with its homologous antigens and *Cucumber mosaic virus* (CMV) control antigen. Furthermore, the gene of viral coat protein was cloned and sequenced. A sequence of 889 nucleotides encoding an open reading frame of 218 amino acid residues was obtained. An identity of 99% and 100%with CMV infecting tomato in nucleotide (D28780、AJ829779) and amino acid (Y10886、AF523340)levels respectively were evidenced. Based on these result a conclusion could be drawn that the virus (SW-1) from diseased Taiwan swallowwort is a isolated of *Cucumber mosaic virus*. To our knowledge, this is the first report of virus disease occurring in Taiwan swallowwort.

(Key words: Taiwan swallowwort viral disease, *Cucumber mosaic virus*, virus identification)