臺灣葡萄毒素病的調查及檢定[1]

Survey of Grapevine Virus Disease in Taiwan

陳慧璘[2]　葉漢民[2]

by

Hueylin Chen Tzeng and Han-ming Yeh

摘　要：由1985至1988年三年間，利用草本植物機械接種、酵素聯結抗體血清檢定、電子顯微鏡檢視、葡萄毒素病指示品種田間嫁接檢定以及葡萄病組織核酸、蛋白成分電泳分析等方法，進行本省栽培葡萄之毒素病調查及檢定，初步結果顯示：葡萄捲葉毒素病爲害本省葡萄之主要毒素病，目前栽培葡萄之受害率約在60%左右；其中主要經濟品種如：巨峰、黑后、義大利，罹病率可能高達80%以上，而常用砧木品種如：8B、SO_4、1202、Harmony 及次要經濟品種如：無子喜樂、德來威、六月鮮、新玫瑰香、紅冠、紫葩、茜萍等亦受感染；各試驗機構所保存的葡萄品種罹病率稍低，約在15～20%之間，其中以早期由亞洲及1983年由南非引進之葡萄品種罹病率特高。

葡萄捲葉毒素病對本省二收葡萄影響極爲顯著，受害葡萄植株樹勢減弱，果實品質、產量均明顯降低，或甚至完全不結果。部分田間採集之葡萄罹病材料，經電子顯微鏡檢視其韌皮組織，發現有粗、細兩型的 Closterovirus 病毒粒子存在，此似顯示：爲害本省葡萄之長絲狀病毒，其種類應在兩種以上。

前　言

葡萄爲長年栽培之果樹，植株的培育、品種的育成均須相當長的時間，而葡萄毒素病又爲左右葡萄品質及產量的重要因子之一 (10,19) ，因此選用無毒苗木，供葡萄栽培、育種之用，對葡萄栽培事業長期發展極爲重要。

本省葡萄栽培歷史極短，在發展的過程中，爲求快速達成品質與產量的提升，以建立栽培葡萄的產業基礎，曾多次大量自國外引進葡萄品種，至今引進的品種已達千種以上 (3,4) ，其中部分適應性及品種特性較優良的品種，已在民間大量栽培。由於本省葡萄品種來源廣泛複雜，葡萄毒素病之潛在威脅甚值得重視。

1）本研究由農委會經費補助，謹此致謝。

2）菸酒公賣局菸葉試驗所技佐。

葡萄毒素病種類相當多[7]，由於病毒的純化困難，毒素病種類的判別須仰賴特定指示品種（Grapevine virus indicator plants）嫁接檢定[10]，而此項工作在執行上相當耗時費力，加以病害潛伏期長，病徵的診斷須兩年以上才能完成，使得葡萄毒素病的檢定較其他果樹困難得多，到目前爲止，有關葡萄毒素病之研究報告不多，研究結果也常不完整。

近2～30年來，本省葡萄栽培已蓬勃發展[1,4]，產業也具雛型，而有關葡萄毒素病之研究，卻到最近幾年才受重視。筆者在1982～1984年蒙國科會遴選支助，前往美國加州大學（UC, Davis）研習葡萄毒素病檢定相關技術，1984年回到菸酒公賣局菸葉試驗所，正式展開本省葡萄毒素病之調查研究，3年來在人力、物力、土地空間極受限的條件下，初步完成部分葡萄苗木毒素病的調查及檢定工作，雖然全面性的調查檢定工作，尚待進一步努力，惟自現有之檢定結果觀之，本省現有葡萄栽培材料普受毒素病感染，嚴重影響果實之成熟品質與產量，已爲我葡萄栽培事業發展有關之研究及從業人員不能坐視之問題。本文中特就最近幾年來，利用現有檢定方法所得到之初步檢定結果，做一概略性報告，以供有關農政單位擬具防治甚或生產計畫策略之參考。

試驗材料及檢定方法

㈠檢定用葡萄樣品的採集及貯存：

於冬季收集葡萄休眠枝條冷藏保存，待翌春取出作爲檢定用樣品材料，另外並於葡萄生長季節，直接自田間採集幼嫩組織，作爲機械接種材料。

㈡葡萄毒素病指示品種的栽培與繁殖：

民國70年自美國加州大學引進經檢定不帶毒的常用葡萄毒素病檢定品種LN-33, Cabernet Franc, Mission 及 St. George 等，於菸試所試驗田隔離栽培，大量繁殖，每年冬季自這些葡萄植株，剪取休眠枝條，於翌春扦插、繁殖，做爲檢定用苗木。利用這種方式，目前每年可獲1000株左右無毒苗，供檢定之需。

㈢葡萄毒素病的檢定方法：

1. 草本植物機械接種檢定：

將葡萄葉片磨碎汁液接種於藜草、千日紅及菸草等一般病毒檢定常用之草本指示植物，以檢定是否有機械傳播性病毒之存在，利用此法可以檢定的已知葡萄毒素病種類，計有葡萄扇葉病毒（Grapevine fanleaf virus）、蕃茄輪點病毒（Tomato ringspot virus）等19種[7]。

2. 酵素聯結抗體法（ELISA）檢定：

利用自行純化所得或自國外索取之葡萄病毒抗血清，加入硫胺（Ammonia Sulfate），抽取其 γ-球蛋白（γ-globulin），再以磷酸酵素（Phosphatase）與其結合後，以 Double-Antibody-Sandwich 的 ELISA 血清檢定法[9]，檢查葡萄病組織汁液中是否存在其對應病毒。

3. 電子顯微鏡檢視：

將葡萄組織汁液陰染，或直接利用病組織超薄切片，在電子顯微鏡中找尋病毒粒子，以確定葡萄植株是否帶毒及所帶病毒種類。

4. 葡萄毒素病指示品種田間嫁接檢定：

此爲美國加州大學種苗服務基金會 (Foundation Seed and Plant Materials Service) 多年來一直所沿用的葡萄毒素病檢定方法[10]，所檢定的主要對象包括葡萄捲葉毒素病 (Grapevine leafroll disease)、葡萄樹皮木栓化病 (Grapevine corky bark disease) 及葡萄莖點病 (Grapevine stem-pitting disease) 等常見的重要葡萄毒素病種類。本研究自民國74年春季起，每年於溫室培育上述由加州引進之葡萄毒素病指示品種，利用嵌芽嫁接法 (Chip-bud grafting)，嫁接待檢定之葡萄芽體，待成活後，再將指示苗木移植田間栽培，其後經18個月的生育及病徵追蹤調查，以確定是否感染上述病毒。

5. 葡萄病組織內病毒特異性核酸及蛋白成分分析：

將感染病毒之葡萄枝葉材料與經田間嫁接檢定或經 ELISA 血清檢定證實不帶毒之健康材料，分別於液態氮中磨碎，並經低速離心淨化後，以 SDS、Phenol 處理，抽取其中可能存在之病毒特異性核酸、蛋白成份 (6,15)，最後利用電泳分析比較健株、病株成分之差異，作爲病毒感染之另一判別依據。

結果及討論

葡萄爲多年生果樹，利用枝條行無性繁殖，由於葡萄毒素病病毒可殘存於休眠枝中，因此一旦使用帶毒苗木做爲繁殖材料，即可能造成病害的快迅蔓延[10]。

本省葡萄的來源極爲複雜，光復前主要由日本引進，其中見諸記錄者約有27個品種，並曾在民間大量栽培[3]；光復後經農委會、農試所、公賣局、臺灣大學、中興大學、葡萄研究中心及民間等先後自世界各地引進之葡萄品種即多達千餘種 (1,3,4)，引種地區遍及世界各葡萄栽培國家。這些品種除少數已推廣栽培者外[3]，其餘均分別保存於各試驗研究機構[1]，除調查其生育特性外，並作爲雜交育種之材料。

葡萄毒素病種類繁多，目前已知的就有30種以上，Bovey 等[7]在1980年依病害傳播方式將其等分爲以下四大類：㈠線蟲傳播性病毒：約有12種左右，其中以葡萄扇葉病毒最爲重要，此類病毒可以機械接種於特定草本指示植物上繁殖，再純化其中所含之病毒，製作抗血清，通常利用血清方法檢定，由於此等病毒可藉由土壤線蟲如 *Xiphinema* sp. 及 *Longidorus* sp. 等之媒介，於田間自然傳播[7]，因此病害一旦發生，即不易根除。㈡土壤眞菌傳播性病毒：已知者僅於草壞疽病毒 (Tobacco necrosis virus) 及蕃茄叢生矮化病毒 (Tomato bushy stunt virus) 二種，由於經濟重要性不大，一般不受重視；㈢蚜蟲 (Aphid) 傳播性病毒：已知者亦僅苜蓿嵌紋病毒 (Alfalfa mosaic virus) 及扁豆萎凋病毒 (Broad bean wilt virus)二種，由於相當罕見，亦常被忽視。㈣病毒特性或傳播媒介 (Vector) 尚未完全瞭解之病毒種類：大約有17種病毒，其中包括葡萄捲葉病毒 (Grapevine leafroll virus)、葡萄樹皮木栓化病毒 (Grapevine corky bark virus) 以及葡萄莖點病毒 (Grapevine stem-pitting virus) 等，爲世界各主要葡萄產區普遍發生，且對葡萄產量品質影響極大 (10,16)，在葡萄生產上極受重視之病毒種類。由於此類病毒不能接種繁殖於草本植物，血清的製作極爲困難，以往僅能藉由嫁接在特定葡萄毒素病指示品種上，所表現的病徵，作爲是否帶毒之判別依據[10]，然此種檢定方法除耗力費時外，更常因個人所用指示品種及栽培條件上的差異，而影響檢定結果。

由於本省葡萄品種來源龐雜，毒素病的檢定必須個別追蹤調查，全面性的檢定工作至爲不易；依據筆者過去三年以田間嫁接及血清檢定所得初步結果，似可證實葡萄捲葉病乃爲爲害本省葡萄之主要毒素病，本病於現行栽培之葡萄品種中發生至爲普遍，初步估計，其田間罹病率可能高達60%以上，其中主要的經濟品種如：巨峰、義大利及黑后等，其罹病率約在80%以上；而常用砧木品種如：8B、SO_4、Harmony、1202，及次要的經濟品種如：無子喜樂（Himrod Seedless）、德拉威（Delware）、六月鮮（Buffalo）、新玫瑰香（Neo Muscate）、紅冠（Royal Red）、紫葩（Super Hamburg）以及茜萃（Champion）等亦受感染；而各試驗研究單位所保存的葡萄品種，罹病率稍低，約在15～20%之間，其中以早期由亞洲及1983年由南非引進之葡萄品種罹病率較高。由上述受檢葡萄之引種資料及本研究檢定結果，已不難看出，本省目前葡萄經濟栽培品種之高罹病率，主要由於早期引種時未有適切的檢疫制度配合，而致選用了帶毒苗木推廣栽培之結果。

葡萄捲葉毒素病爲世界各主要葡萄栽培國家普遍存在之重要病害，受害葡萄葉片上常見病徵包括脈間紅化、黃化、捲曲等，由於本病之爲害嚴重影響葡萄之品質與產量(10,19)，對整個葡萄栽培事業影響極大，因此世界各主要葡萄栽培國家無不將其視爲主要的檢疫對象及研究重點。關於本病病毒特性，雖則 Bovey等在1980年將其列爲第四類（病毒特性或傳播媒介未明之病毒）(7)，唯近年來經不斷的分析研究，其病毒特性已逐漸明朗，雖然利用純化病毒接種健康苗木，使其發病尚無法達成，但愈來愈多的試驗結果顯示長細絲狀病毒（Closterovirus）與本病的發生關係至爲密切(6,7,12,14,15,20)，此外更有報告顯示粉介殼蟲(Mealy bug)可能爲本病毒於田間傳播之媒介昆蟲(17,18)。

在本調查檢定過程中，對經檢定證實被病毒感染之葡萄植株，進一步進行田間病徵及生育追蹤調查，發現多有葉片黃化、紅化、向後捲曲、春季萌芽及果實成熟延遲、成熟不一、香味減低及果串變小之趨勢，且此種現象以二收葡萄尤爲明顯；此外部分罹病植株並有樹勢急速衰退，品質產量明顯低降，甚至完全不結果等情形。

另在本病病原研究方面，利用病組織超薄切片技術以電子顯微鏡檢視上述田間檢定或血清檢定所發現之葡萄罹病材料，已證實病組織中確有長細絲狀的 Closterovirus 存在，爲進一步瞭解此一病毒在本省栽培葡萄中之分佈情形，本研究乃於最近開始嘗試有關本病毒之純化及抗血清製作等工作，惟由於此類病毒在植株中之存在屬韌皮部局限型（Phloem-limited），於罹病材料中病毒含量極低，利用草本植物接種繁殖病毒，一直無法成功。而利用單寧、醣類含量極高的葡萄病組織，直接純化抽取其中所含病毒成份，作爲抗血清製之用，則或由於葡萄 Closterovirus 特別細長(18)，在雜質含量極高且酸度極低（pH 3～4）(8)的葡萄汁液中易斷裂分解，病毒的純化一直未如理想。國外有關本病毒之純化及抗血清製作研究雖已有報導(12,20)，然其力價仍相當低，且純度不佳，如何改進本病毒之純化技術並配合近幾年來在本省蓬勃發展之各種生物技術，利用純化得到之病毒核酸或鞘蛋白行電泳分析(12,20)或以融合瘤（Hybridoma）技術製備價高力及專一性好的病毒單元抗體（Monoclonal antibody)(13)，以供病害全面快速檢診之用，將是今後努力之目標。

除捲葉病毒外，本研究利用草本植物機械接種及 ELISA 血清檢定，調查由全省各試驗機構及民間葡萄栽培區收集的356個葡萄樣品中，截至目前爲止，尚未找到任何可

經由機械接種傳播之葡萄病毒，但由於媒介葡萄病毒之 *Xiphinema* sp. 線蟲，曾在本省葡萄園中發現[2]，本省至今尚少見此類線蟲傳播病毒之發生，可謂非常幸運。爲免除本省葡萄受此類高危險性病毒之威脅，今後應加强引進材料之檢疫工作；而針對本省目前發生已極嚴重之葡萄捲葉病毒，以下幾點淺見或可供有關農政單位擬定對應防治策略之參考：

1. 確立本省葡萄毒素病之檢疫系統，以免有關病原自引進品種材料中帶入。
2. 利用熱處理及組織培養技術，大量繁殖較受消費大衆歡迎之品種如巨峰、黑后、義大利等之無毒苗木[5]，供農友苗木更新之用。
3. 由於粉介殼蟲可能爲葡萄捲葉毒素病之媒介昆蟲，而此害蟲在本省葡萄上分佈極廣（17,18），因此在苗木更新時，應徹底除去舊園中之罹病殘株及介殼蟲，以免病害再度蔓延。
4. 在外國葡萄及葡萄酒大舉進口的競爭下，減少栽培面積、降低生產成本及提高葡萄品質與產量，將是今後葡萄生產事業發展之方向，因此對於罹病嚴重之葡萄園，應輔導其廢耕、輪作，而對新植果園，則宜推廣經檢定合格之無毒苗木，以改進品質。

參考文獻

1. 王爲一。1988。葡萄新品種引進及選拔。葡萄產業研究與發展研討會論文摘要。臺灣省農業試驗所。23pp.
2. 林奕耀、蔡東纂。1984。臺灣地區葡萄園中植物寄生性線蟲相之調查。中國園藝30：173—179。
3. 康有德、林貞慧、陳志宏。1973。臺灣之葡萄引種調查。科學農業 21：420—427。
4. 蔣青華、何妙齡。1979。葡萄之引種觀察與雜交育種初報。中國園藝25：16—29。
5. 井理正彥、志村富男、戶川英夫、上野雄靖。1982。醸造用ブドウの熱處理および生長點培養による Grapevine Leafroll Virus の無毒化について。日植病報48：685—687。
6. Boccardo, G. and M. D'Aguilio. 1981. The protein and nucleic acid of a closterovirus isolated from a grapevine with stem-pitting symptoms. J. Gen. Virol. 53：179—182.
7. Bovey, R., W. Gartel, W. B. Hewitt, G. P. Martelli and A. Vuittenee. 1980. Virus and virus-like diseases of grapevines. Ed. Payot (Lausanne), La Maison Rustique (Paris), Verlag E. Ulmer (Stuttgart). 181 pp.
8. 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 (London) 187：577—579.
9. 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.

10. Goheen, A. C. and J. A. Cook. 1959. Leafroll (red-leaf or rougeau) and its effects on vine growth, fruit quality and yield. Amer. J. Enol. and Vit. 10 : 173—181.
11. Gonsalves , D. and F. Zee. 1986. Recent research development in virus diseases of grapevine. p. 104—108 In "Plant Virus Diseases of Horticultural Crops in the Tropics and Subtropics". FFTC Books Series No. 33.
12. Iwanami, T., S. Namba, S. Yamashita, Y. Doi, J. Takahashi and K. Ishii. 1987. Purification of grapevine leafroll virus (GLRV) Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 53 : 655—658.
13. Kohler, G. adn C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256 : 495—497.
14. Milne, R. G., M. Conti, D. E. Lesemann, G. Stellmach, Enda Tanne and J. Cohen. 1984. Closterovirus-like particles of two types associated with diseased grapevines. Phytopath. Z. 110 : 360—368.
15. Mossop, D. W., D. R. Elliott, K. D. Richards. 1980. Association of closterovirus-like particles and high molecular weight double-stranded RNA with grapevine affected by leafroll disease. New Zealand J. Agri. Res. 28 : 419—425.
16. Olmo, H. P. 1975. The California grape certification program. Cons. Prin. Empres. Cadiz. 2(6) : 379—389.
17. Rosciglione, B., M. A. Castellano, G. P. Martelli., V. Savino and Cannizzo, G. 1983. Mealybug transmission of grapevine virus A. Vitis 22 : 331—347.
18. Rosciglione, B. and P. Gugerli. 1987. (Leaf roll and stem pitting disease of grapevine microscopic and serological analysis.) Maladies de l'lenroulement et du bois strie de la vigne: analyse microscopique et serologique. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 18(4): 207—211.
19. Scheu, G. 1936. Mein Winzerbuch. Reichsnahrstands-Verlags, G. M. B. H., Berlin. 274pp.
20. Zee, F., D. Gonsalves, A. Goheen, K. S. Kin, R. Pool and R. F. Lee. 1987. Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated closteroviruslike particles. Phytopathology 77 : 1427—1434.

Summary

Occurrence of various grapevine virus diseases in Taiwan was investigated. The viral infections of examined samples were determined by mechanical inoculation on various herbaceous indexing hosts, ELISA, electron microscopy, grafting field indexing using specific grapevine virus indicator plants and analyses of nucleic acid and protein contents of the examined grapevine tissue extracts. During the past three years (1985—1988), a total of 810 grapevine samples were collected from different locations. Up to now, leafroll was the only viral disease detected. About 60% of the tested samples collected from the commercial vineyards showed indication of leafroll virus infection. Incidence of this infection detected from field grown table grapes like Kyoho, Italia, or wine grapes like Black Queen were over 80%; While rootstocks like 8B, SO_4, 1202 and Harmony and other commercial cultivars like Himrod Seedless, Delaware, Buffalo, Neo Muscate, Royal Red, Super Hamburg and Champion were badly affected. The grapevine cultivars currently grown in the Cultivar Collection Centers of Taiwan Tobacco Research Institute, Taiwan Agriculture Research Institute and The Grape Research Center of National Chung Hsing University were also not exempted from the viral infection. Disease incidence detected from these localities were approximately 15—20%; and among them cultivars introduced early from vicinity Asian countries and cultivars introduced from South Africa were the ones affected most. In addition to disease survey, influence of leafroll infection on growth and yield were also examined during the course of study. The impact of leaf roll infection on grapevine production appeared to be most prominent for the two-crop system in which very low or even zero yield due to the viral infection was frequently observed. By electron microscopic study, at least two types of closterovirus-like particles have been discovered from the virus affected samples. Efforts to further characterize the involved viral entities are currently underway.