

薊馬傳播番茄斑萎病毒屬(*Tospovirus*)病毒之分子診斷鑑定要領

詹富智 助理教授、葉錫東 教授

國立中興大學植物病理學系

電子郵件：fjjan@nchu.edu.tw；傳真：04-2285-4145

摘 要

番茄斑萎病毒屬 (*Tospovirus*) 為一群帶有外套膜並可經由薊馬傳播的病毒，寄主範圍相當廣大且在世界各地許多重要經濟作物上造成重大損失。由於此病毒的寄主範圍非常廣泛，且病徵差異大，目前的分類依據以血清類緣關係及核鞘蛋白 (nucleocapsid protein gene, N gene) 核酸序列分析為主，又由於此病毒顆粒具有套膜，粒子極不穩定，所以純化困難，抗血清製備不易，因此如何在核酸分子層次上研發病毒的檢測工具實為當務之急。為了研發可以廣效性的偵測不同主要血清型 tospoviruses 之診斷工具，我們實驗室乃以電腦針對已發表及我們實驗室已完成之 tospoviruses 病毒核酸序列進行分析比對，發現不同 tospoviruses 在 L RNA 之複製酵素 (replicase) 區域具有最高胺基酸相似性，並具有高度的 RNA 相同區域，故針對 L RNA 上高度相同序列區域，設計二組不同核酸之簡併式引子 (degenerate primers)，並進行逆轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 以進行偵測，所得之核酸片段再以限制酵素圖譜比對及核酸序列分析予以確立。我們已證實此簡併式引子可以廣泛性的檢測不同血清型 tospoviruses，並且我們也已成功的利用此二對引子對來檢測田間感染不同血清型 tospoviruses 的西瓜、冬瓜、洋桔梗、彩色海芋及蝴蝶蘭等。

關鍵詞：番茄斑萎病毒屬、*Tospovirus*、分子檢測、簡併式引子、degenerate primers、RT-PCR

緒 言

Tospovirus 屬病毒是一群經由薊馬傳播的病毒屬 (Wijkamp *et al.*, 1993) 也是 *Bunyaviridae* 科中唯一能感染植物的病毒屬 (Sakimura, 1962)。番茄斑萎病毒屬病毒具有廣泛寄主範圍，能感染超過82科900種植物，在全世界造成食用作物及觀賞作物上的嚴重的經濟危害 (Prins and Goldbach, 1998)。番茄斑萎病毒屬病毒為一具有套膜的球型病毒 (Black *et al.*, 1963; Ie, 1970; Milne, 1970; van Kammen *et al.*, 1966)，其中包裹了三條單股基因體RNA (ssRNA)，分別為S RNA、M RNA及L RNA (Elliott, 1990; German *et al.*, 1992; van den Hurk *et al.*, 1977)。L RNA以病毒互補股 (viral complementary sense) 對應RNA複製酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 基因 (de Haan *et al.*, 1991)，M RNA則分別以病毒股 (viral sense) 及病毒互補股對應非結構蛋白 (nonstructural protein) NSm 基因及醣蛋白 (glycoproteins) G1/G2基因 (Kormelink *et al.*, 1992)；S RNA分別以病毒股及病毒互補股對應非結構蛋白 NSs 基因及核鞘蛋白 (nucleocapsid, N) 基因 (de Haan *et al.*, 1992; Law *et al.*, 1991; Yeh and Chang, 1995; Yeh *et al.*, 1996)。目前番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、鳳仙花壞疽斑點病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV)、花生頂牙壞疽病毒 (*Peanut bud necrosis virus*, PBNV) 及西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) 之 L、M、S RNAs 皆已被解序完成。TSWV的 L RNA 有8897 個核苷酸 (de Haan *et al.*, 1991)。INSV的 L RNA，有 8876 個核苷酸 (van Poelwijk *et al.*, 1997)。PBNV的 L RNA有 8911 個核苷酸 (Gowda *et al.*, 1998)。WSMoV 的 L RNA有 8917 個核苷酸 (Chu *et al.*, 2001)。TSWV 的M RNA有 4821 個核苷酸 (Kormelink *et al.*, 1992)，INSV 有 4972 個 (Law *et al.*, 1992)，WSMoV有 4880 個 (Chu and Yeh, 1998)，PBNV 有 4801 個 (Satyanarayana *et al.*, 1996b) 核苷酸。至於 S RNA 方面，

則介於2916~3534個核苷酸 (de Haan *et al.*, 1990; 1992; Pang *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1996b; Satyanarayana *et al.*, 1996a)。

利用血清學關係進行分類，是區分不同*Tospovirus*屬病毒主要方法之一 (Goldbach and Kuo, 1996)，最初以不同番茄斑萎病毒屬病毒的核鞘蛋白的血清學關係可以將番茄斑萎病毒屬病毒區分為四種血清群 (serogroup)，第一血清群 (serogroup I) 包括TSWV，第二血清群 (serogroup II) 包括花生輪點病毒 (*Groundnut ringspot virus*, GRSV) 和番茄黃化斑點病毒 (*Tomato chlorotic spot virus*, TCSV)，第三血清群 (serogroup III) 包括INSV，第四血清群 (serogroup IV) 包括WSMoV和PBNV (de Avila *et al.*, 1990; Law and Moyer, 1990; Adam *et al.*, 1993; Heinze *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 1996)。然而，隨著愈來愈多新的*Tospovirus*屬病毒被發現，其中包括花生黃化斑點病毒 (*Peanut yellow spot virus*, PYSV) (Satyanarayana *et al.*, 1998)、鳶尾花黃化斑點病毒 (*Iris yellow spot virus*, IYSV) (Cortes *et al.*, 1998)、酸漿嚴重斑駁病毒 (*Physalis severe mottle virus*, PSMV) (Cortes *et al.*, 2001)、PCFV等數種病毒，這些病毒被發現與其它*Tospovirus*屬病毒並無血清學關係而可能是屬於關係較遠的血清群。

除此之外，某些屬於不同血清群的病毒，如TSWV、TCSV、GRSV之間卻有輕微的血清反應 (de Avila *et al.*, 1990; Adam *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 2001)。因此，原有以數字 (I, II, III,...) 的血清群分類系統應該被取消，改以該血清群代表病毒的名稱 (type name)來命名該血清群 (Chu *et al.*, 2001; Jan *et al.*, 2003)。例如第一血清型 (serogroup I) 應改為TSWV血清群 (TSWV serogroup)。此外，在N基因上具有高度序列相同度的番茄斑萎病毒屬病毒同時也應具有血清學關聯性，這些病毒便被分類在同一血清群中，根據這個分類原則，目前我們將已知的16種番茄斑萎病毒屬病毒可被分為三個主要血清群，TSWV、WSMoV、IYSV血清群及四個含單一病毒的獨立血清型 (serotype)，INSV、PYSV、PCFV及MYSV (Jan *et al.*, 2003)。

番茄斑萎病毒屬 (*Tospovirus*) 之病毒遍及世界各地，目前已是危害熱帶、亞熱帶及溫帶地區重要經濟作物中最嚴重的病毒群之一 (Rddy and Wightman, 1988; German *et al.*, 1992)。晚近在台灣亦有多起報告，證實番茄斑萎病毒屬病毒會感染葫蘆科作物、茄科作物、豆科作物及花卉作物等，且造成損害非常嚴重，已成為此類作物生產限制因子之一。在臺灣感染瓜類之西瓜銀斑病毒 (WSMoV)、在本省茄科及葫蘆科作物中造成嚴重損失，已成為本省瓜類之首要殺手 (Yeh *et al.*, 1988; 1992; Chen *et al.*, 1995)，並為本省夏季西瓜及秋冬季洋香瓜生產之最重要限制因子。亞蔬中心亦發現其於本省台南地區之番茄大發生造成嚴重損失 (Green and Chou, 1991)。1992年，陳氏於嘉義鹿草、彰化秀水等地發現少數花生葉片有輪紋之病徵 (Chen *et al.*, 1993)，在電顯下觀察可發現類似 tospovirus之粒子，接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Wild) 可發現有輪紋病斑，而後證實其媒介昆蟲為小黃薊馬 (*Scirtothrips dorsalis* Hood)，此病毒先被稱為 Tospo-P (Chao *et al.*, 1995) 後被命名為 *Peanut chlorotic fan-spot virus* (PCFV) (Chen *et al.*, 1996)。

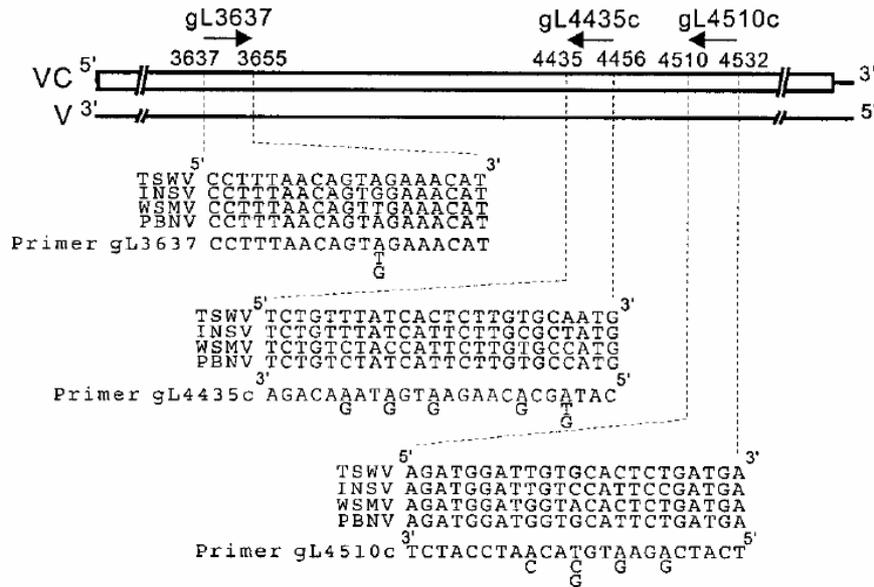
由於此屬病毒寄主範圍廣泛，且病徵差異大，不易以寄主範圍及病徵作為該病毒鑑定之依據，所以目前以血清類緣關係及核酸序列分析為重要依據。雖然目前我們實驗室已順利製備完成不同血清型之抗血清，但由於番茄斑萎病毒屬病毒具有套膜，粒子不穩定，所以純化困難，抗血清製備不易，因此如何在核酸分子層次上研發病毒的檢測實為當務之急。

薊馬傳播番茄斑萎病毒屬廣泛性檢測技術之開發

L RNA核酸序列分析及簡併式引子之設計

依據已發之 TSWV、INSV、PBNV 及 WSMoV L RNA 序列，經由

電腦比對，在L RNA之複製酵素 (replicase) 高度共同區域設計了二對簡併式引子 (圖一)。引子對gL3637/gL4435c可對L RNA擴增出一條約0.81 kb DNA 片段。而引子對gL3637/gL4510c則預期可對L RNA擴增出一條約0.89 kb之DNA 片段。



圖一 · 由TSWV、INSV、WSMoV及PBNV的L RNA共同區域所設計之簡併式引子。

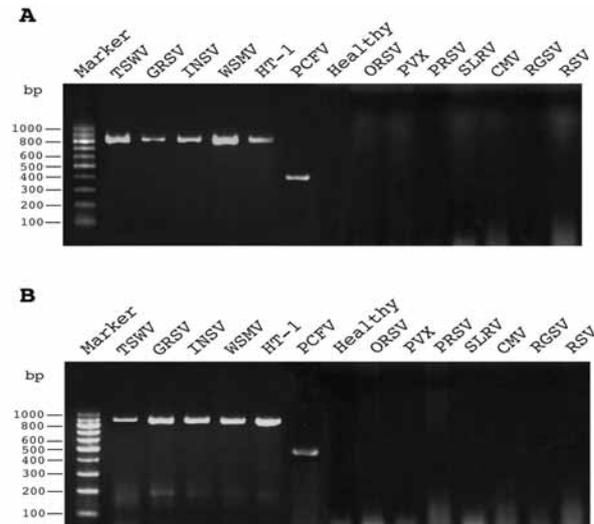
Fig. 1. Sequences of degenerate primers designed from the sequences of the conserved regions of L RNAs of TSWV, INSV, WSMoV, and PBNV. Arrows indicate regions where degenerate primers bind, using WSMoV L RNA as an example. The numbers indicate the nucleotide positions targeted and correspond to the viral complementary strand of WSMoV L RNA (Chu et al., 2001).

利用簡併式引子偵測不同血清型tospoviruses

為了測試及評估以上所設計之L RNA簡併式引子對是否可偵測不同血清型之tospoviruses，在抽取各典型代表病毒株系之total RNA後，

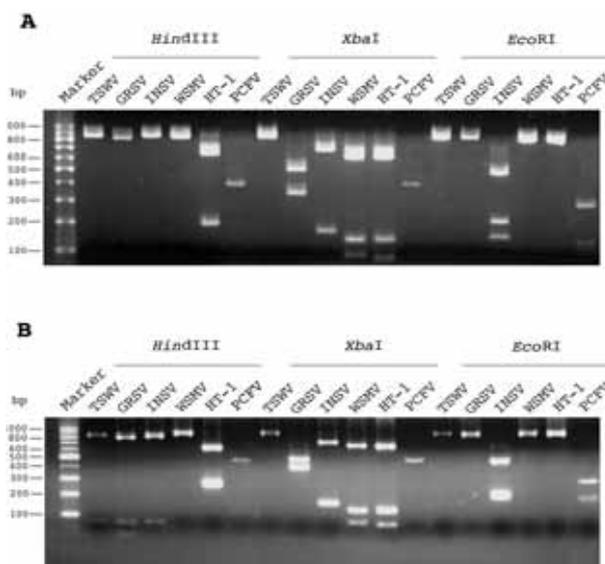
以上述之L RNA簡併式引子對進行RT-PCR之增幅，結果顯示引子對gL3637/gL4453c及gL3637/gL4510c對TSWV、INSV及WSMoV的L RNA分別可增幅出預期的0.81 kb及0.89 kb DNA 片段（圖二）。此外這二組簡併式引子對亦可對核酸序列尚未知的GRSV及HT-1 L RNA增幅出上述的0.81 kb及0.89 kb DNA 片段。另外此簡併式引子對亦可對另一未知其L RNA核酸序列的不同血清型病毒PCFV增幅出一段0.38 kb及0.46 kb DNA 片段（圖二）。除了對*Tospovirus*病毒有廣效性反應外，此二對簡併式引子對，對其他病毒屬，例如*Odontoglossum ringspot virus* (ORSV, *Tobamovirus*), *Potato X virus* (PVX, *Potexvirus*), *Papaya ringspot virus* (PRSV, *Potyvirus*), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV, *Nepovirus*), *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*), *Rice grassy stunt virus* (RGSV, *Tenuivirus*), *Rice stripe virus* (RSV, *Tenuivirus*),及健康植物則無任何增幅產物之產生。TSWV, GRSV, INSV, WSMoV, HT-1及PCFV的RT-PCR產物則進一步進行限制酵素HindIII, XbaI及EcoRI圖譜分析（圖三），WSMoV, TSWV, INSV得如預期的限制酵素圖譜。而HT-1, GRSV及PCFV亦有特殊限制圖譜。

RT-PCR產物進一步以TA cloning kit選殖後，經DNA核酸序列解析以確認簡併式引子對確實增幅出L RNA的產物。核酸序列解析結果顯示WSMoV, TSWV及INSV的核酸序列與已發表之報告相同。GRSV, HT-1及PCFV雖然尚未有發表的L RNA核酸序列，但我們所得的L RNA核酸序列與已知tospoviruses的L RNA排互對映良好並含有已知的某些motif。以上結果顯示，gL3637/gL4453c與gL3637/gL4510c二組L RNA簡併式引子可與不同血清型的tospoviruses有反應，且不與其他非*Tospovirus*屬的病毒反應。



圖二 · 利用L RNA簡併式引子對(A)gL3637/gL4435c及
(B)gL3637/gL4510c偵測不同血清型tospoviruses。

Fig. 2. RT-PCR analyses of tospoviruses from different serogroups, and plant viruses of other genera, using primer pairs to the conserved regions of the L genes, gL3637/gL4435c (A) and gL3637/gL4510c (B). RT-PCR was performed using total RNAs extracted from plants infected with individual viruses as templates (Chu et al., 2001).



圖三·限制酵素切割與不同血清型tospoviruses有共同反應之L RNA簡併式引子之RT-PCR產物。

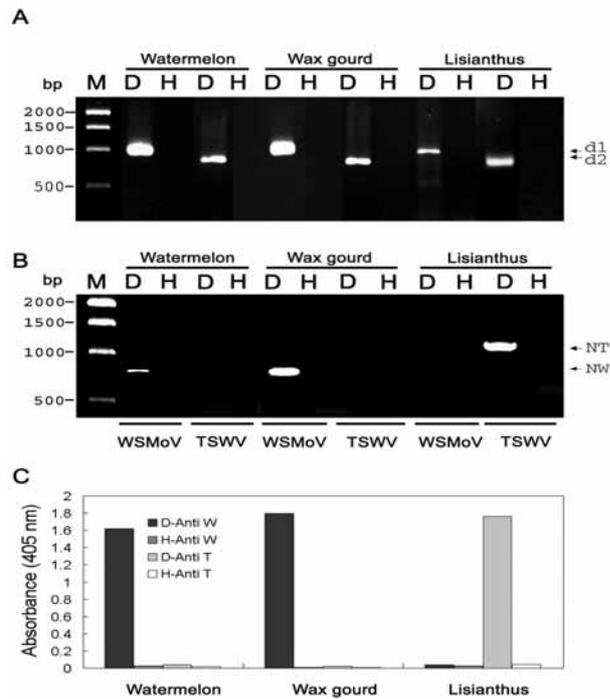
Fig. 3. Restriction enzyme analyses of RT-PCR products amplified from tospoviruses in different serogroups using degenerate primers pairs to the conserved regions of L genes, gL3637/gL4435c (A) and gL3637/gL4510c (B) Three restriction enzymes *HindIII*, *XbaI*, and *EcoRI* were used. Combinations of the viruses and enzymes are indicated above each set (Chu et al., 2001).

利用L RNA簡併式引子偵測田間不同血清型的tospoviruses

為了進一步證明以上所設計的L RNA簡併式引子可用來偵測田間自然感染的不同血清型的 tospoviruses，以 gL3637/gL4435c 及 gL3637/gL4510c 簡併式引子對15個西瓜、12個冬瓜及3個洋桔梗田間發病樣品進行RT-PCR反應後，其中12個西瓜、8個冬瓜及3個洋桔梗樣品可增幅出預期大小的DNA 片段（圖四）。進一步以WSMoV及TSWV N gene的引子對進行RT-PCR，發現所有的西瓜（12個）及冬瓜（8個）可以WSMoV引子對增幅出預期的DNA 片段約0.7 kb。而洋桔梗（3個）可以TSWV N gene引子對增幅出預期的1.0 kb DNA 片段。

此外以WSMoV及TSWV NP抗血清與RT-PCR陽性反應之樣品進行

ELISA檢測發現，10個西瓜及7個冬瓜樣品為WSMoV ELISA陽性反應，而3個洋桔梗樣品則為TSWV ELISA陽性反應。以上結果顯示，L RNA簡併式引子不但可偵測溫室中五種不同血清型的tospoviruses，亦可用來廣泛性的偵測田間感染的tospoviruses，其靈感性比ELISA還要高。



圖四·利用L RNA簡併式引子對偵測田間不同血清型之tospoviruses。
 Fig. 4. Detection of tospoviruses in field samples by RT-PCR and indirect ELISA. (A) The total RNAs from field samples and healthy plants were amplified by two pairs of degenerate primers derived from L RNAs of the tospoviruses (shown in above panel) and NP specific primers to WSMV and TSWV (shown in down panel). (B) The crude extracts from field samples and healthy plants were tested by NP antiserum to WSMV and TSWV. The host plants used is indicated in the order from left to right. M: marker, D:diseased sample, H healthy control. The d1 and d2 represent for the products

amplified by primer pairs gL3637/gL4510c and gL3637/gL4435c, respectively. The NT and NW represent for the products amplified by TSWV- and WSMV-NP specific primers, respectively. The Anti W and Anti T represent for the NP antiserum to WSMV and TSWV, respectively (Chu et al., 2001).

利用L RNA簡併式引子偵測蝴蝶蘭tospovirus

蘭花的病毒病害相當多，目前已有超過28種病毒被紀錄（張，2001; Zettler *et al.*, 1990; Lawson and Hsu, 1995），主要包括有 *Potexvirus* 屬的東亞蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV) (Francki, 1970)、*Tobamovirus* 屬的齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) (Jensen and Gold, 1951)、菸草嵌紋病毒蘭花分離株 (*Tobacco mosaic virus-orchid*, TMV-orchid) (Corbett, 1967), *Potyvirus* 屬的菜豆黃化嵌紋病毒 (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) (Lesemann and Koenig, 1985)、石斛蘭嵌紋病毒 (*Dendrobium mosaic virus*, DenMV) (Inouye, 1973)、苜蓿黃脈病毒 (*Clover yellow vein virus*, CYVV) (Inouye *et al.*, 1988)、蕪菁嵌紋病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV) (Lawson and Hsu, 1995)、香子蘭嵌紋病 (*Vanilla mosaic virus*, VaMV) (Wisler *et al.*, 1987)、*Closterovirus* 屬的石斛蘭葉脈壞疽病毒 (*Dendrobium vein necrosis virus*, DVNV) (Lesemann, 1977)、*Tobravirus* 屬的菸草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) (Lesemann and Vetten, 1985)、*Tombusvirus* 屬的東亞蘭輪點病毒 (*Cymbidium ringspot virus*, CyRSV) (Hollings and Stone, 1977)、*Cucumovirus* 屬的胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Inouye, 1969; Zettler *et al.*, 1990)、*Nepovirus* 屬的番茄輪點病毒 (*Tomato ringspot virus*, TomRSV) (Goff and Corbett, 1977)、*Rhabdovirus* 屬的蘭花微斑病毒 (*Orchid fleck virus*, OFV) (Chang *et al.*, 1976; Doi and Yora, 1977) 及番茄斑萎病毒屬 (*Tospovirus*) 的番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) (Hu *et al.*, 1992)、鳳仙花壞疽斑點病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) (Lawson *et al.*,

1990)。

目前已知可以感染蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis spp.*) 的病毒包括上述的 CymMV、ORSV、CMV、CyRSV (Lawson and Hsu, 1995)、OFV (Lawson *et al.*, 1986) 一個疑似 *Closterovirus* 屬的病毒 (Lesemann, 1977) 及一個 rhabdovirus (Lawson *et al.*, 1986)，而台灣已經有紀錄發生的病毒種類只有 CymMV、ORSV 及 CMV 三種 (柯, 1989; Ko, 1988)。

2002年彰化縣蝴蝶蘭栽作地區發現有別於上述台灣蘭花病毒感染的病徵，在罹病蘭花葉片產生大型黃化斑點，直徑約1.5~3.2cm，黃化斑中央部形成壞疽斑，終致中心壞疽斑組織壞死（直徑0.9~2.0cm），而周圍斑仍保持黃化（圖五），台中改良場陳慶忠博士以蝴蝶蘭病組織在電顯下可觀察到有直徑約70~90 nm的球型病毒顆粒。利用間接酵素聯結免疫吸附法（indirect enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA）進行分析，發現此一分離自蝴蝶蘭的病毒可與由番茄斑萎病毒屬第四血清型西瓜銀斑病毒（*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV）核鞘蛋白（nucleocapsid proteins, NP）所製備的血清有反應，與其它 *Tospovirus* 屬病毒，包括 TSWV、INSV 和花生黃化扇斑病毒（*Peanut chlorotic fan spot virus*, PCFV）的血清不發生反應（Chen *et al.*, 2003）。

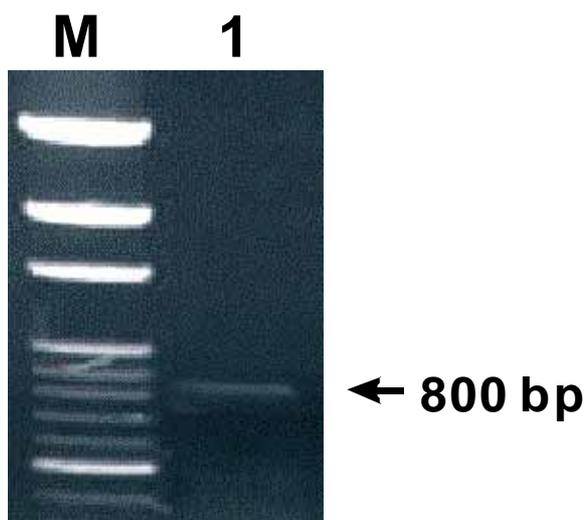
接著我們實驗室利用上述針對番茄斑萎病毒屬病毒 L RNA 保留區域內設計的簡併式引子對 gL4435c /gL3637 (Chu *et al.*, 2001) 對由此蝴蝶蘭病毒感染之蝴蝶蘭葉部病斑組織所萃取出之總量核糖核酸作為模板，進行反轉錄-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)增幅出一大小約800 bp之核酸片段(圖六)，將該反物產物利用 TOPO TA 選殖套組 (TOPO TA cloning kit) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 進行基因選殖並解序，得一具有 816 bp 之 L RNA 選殖株；經 GenBank 之 BLAST program 及 DNASTA 軟體比對序列，結果發現其序列與 WSMoV、PBNV、TSWV 和 INSV 等四種已知 L RNA 核酸序列的病毒分別有 80.8%、82.8%、58.7%、59.9%

的核酸相同度 (identities) 及97.8%、95.7%、66.5%、66.9%胺基酸相同度 (Zheng *et al.*, 2003)。TSWV 及 INSV是已知能感染蘭花的兩種 *Tospovirus*屬病毒，這兩種病毒是許多觀賞植物、蔬菜和田間作物的病原病毒，同時也造成溫室花卉作物嚴重病害。TSWV感染的文心蘭在夏威夷被發現，造成從黃化輪斑到壞疽斑不同程度的病徵 (Hu *et al.*, 1993)，受INSV感染的蘭花則於加州被發現 (Lawson, 1990)。以上種種的特性顯示這個在台灣分離自蝴蝶蘭的病毒是屬於番茄斑萎病毒屬WSMoV血清群的病毒 (Zheng *et al.*, 2003)。



圖五、蝴蝶蘭tospovirus所引起之蝴蝶蘭黃化壞疽斑病徵

Fig. 5. *Phalaenopsis* orchids showing chlorotic and necrotic spot symptoms on leaves by the infection of *Phalaenopsis* tospovirus.



圖六、利用L RNA簡併式引子對gL3637/gL4435c偵測蝴蝶蘭tospovirus
Fig. 6. RT-PCR analyses of tospovirus from *Phalaenopsis* orchid using primer pairs to the conserved regions of the L genes, gL3637/gL4435c. RT-PCR was performed using total RNAs extracted from plants infected with *Phalaenopsis* tospovirus as templates.

結 語

*Tospovirus*屬病毒遍及世界各地，寄主範圍廣大，已有記載的達82科900多種植物，目前在台灣已發現有TSWV，WSMoV及PCFV三種。近年來台灣經濟自由化、國際化，在加入WTO後，國際間之種苗、種子及其他農產品之交易愈是頻繁，而檢防疫工作則愈形重要且困難如何建立快速而可廣泛性偵測不同病毒群的工具為刻不容緩的工作。研發快速偵測及鑑定不同血清型番茄斑萎病毒屬病毒之工具為我們實驗室長期研究目標之一。目前我們研發的L RNA簡併式引子對可廣泛性

的偵測溫室及田間感染不同作物的不同血清型 tospoviruses，例如我們已成功地從蝴蝶蘭植株上檢測出一未曾報導可感染蝴蝶蘭之 tospovirus，因此一蝴蝶蘭 tospovirus 可於蝴蝶蘭植株引起黃化壞疽斑點，而病徵有隨時間愈益擴展之現象，造成蝴蝶蘭葉片之美觀嚴重受損，亦影響我國蝴蝶蘭外銷時之商譽，本實驗室正積極針對此蝴蝶蘭 tospovirus 基因體核酸序列之定序以鑑定該病毒之分類地位。由前述之研究結果得知我們已能充分應用所研發之 L RNA 簡併式引子，可快速地、簡便地廣泛性的檢測不同血清型番茄斑萎病毒屬病毒，不僅可針對台灣，並且亦可對全球在田間 tospoviruses 病害上提供簡易且精確快速之診斷工具。

番茄斑萎病毒屬 (*Tospovirus*) 分子診斷鑑定操作

診斷方法：反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

診斷方法簡介

本法乃依據已番茄斑萎病毒屬之番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、鳳仙花壞疽斑點病毒(*Impatiens necrotic spot virus*; INSV)、花生頂芽壞疽病毒 (*Peanut bud necrosis virus*; PBNV) 及西瓜銀斑病毒(*Watermelon silver mottle virus*; WSMoV) L RNA 序列，經由電腦比對，在 L RNA 之複製酵素 (replicase) 高度共同區域設計了二對簡併式引子 (圖一) 進行 RT-PCR。引子對 gL3637/gL4453c 可對 L RNA 擴增出一條約 0.81 kbp DNA 片段; 而引子對 gL3637/gL4510c 則預期可對 L RNA 擴增出一條約 0.89 kbp 之 DNA 片段。先將待檢之作物葉片組織抽取總量 RNA，利用下游引子及反轉錄酵素增幅出 cDNA 後，以此 cDNA 產物與設計之簡併式引子對進行聚合酶鏈鎖反應，再以瓊脂膠體電泳分離並比對核酸片段大小，以準確判斷是否感染

*Tospovirus*屬病毒。此一RT-PCR之偵測技術可提供快速且靈敏度高之廣效性檢測不同血清型tospoviruses病毒之診斷鑑定工具。

1. 設備與材料

1.1設備

- 1.1.1 聚合酶鏈鎖反應器 (PCR machine)
- 1.1.2 桌上型微量離心機(1.7-ml 微量離心管用)
- 1.1.3 水平核酸電泳槽
- 1.1.4 紫外線燈箱及電泳照相系統箱
- 1.1.5 研钵及杵

1.2試材與試劑

- 1.2.1 Solution R (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS)
- 1.2.2 Phenol saturated with Tris buffer (pH 4.3), chloroform/isoamyl alcohol (24:1)
- 1.2.3 5 M LiCl
- 1.2.4 0.3 M NaOAc (sodium acetate, pH 5.2)
- 1.2.5 70% 酒精及絕對酒精
- 1.2.6 微量離心管(1.7-ml及0.2-ml或0.5-ml)
- 1.2.7 微量分注器(2 μ l、20 μ l、200 μ l、1000 μ l)
- 1.2.8 Epicentre RT-PCR kit [M-MLV reverse transcriptase、10X reverse transcription buffer、2.5 mM dNTP mixture (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、0.1 M DTT、RNasin]、DEPC-treated water
- 1.2.9 Taq DNA polymerase、10X Taq reaction buffer [500 mM KCl、17.5 mM MgCl₂、100 mM Tris-HCl (pH9.0)、1% Triton X-100]
- 1.2.10 Degenerated primers (100 ng/ μ l): *Tospovirus* L RNA序列的高度

相同區所設計二組引子對(圖一)，上游引子gL4435c之序列為5'-CAT(A/T/G)GC(A/G)CAAGA(A/G)TG(A/G)TA(A/G)ACAGA-3'及gL4510c之序列為5'-TCATC(A/G)GA(A/G)TG(C/G/T)AC(A/C)ATCCATCT-3'，下游引子gL3637之序列為5'-CCTTTAACAGT(A/G/T)GAAACAT-3'。引子對gL3637/gL4453c可對L RNA擴增出一條約0.81 kbp DNA片段;而引子對gL3637/gL4510c則預期可對L RNA擴增出一條約0.89 kbp之DNA片段。

- 1.2.11 0.8% 瓊脂凝膠(agarose in TAE buffer)
- 1.2.12 染色劑：ethidium bromide (EtBr)
- 1.2.13 DNA Marker
- 1.2.14 1X TAE緩衝液：40 mM Tris、1 mM EDTA、20 mM acetic acid

2. 步驟與方法

2.1操作步驟

以修改過之植物總量RNA (total RNA)萃取法(Napoli et al., 1990)抽取植物總量RNA，再經RT-PCR增幅反應，程序如下 (Jan et al., 2000)：

- 2.1.1 將欲檢測之植物葉片約100~400 mg以液態氮磨成粉狀後加到已含500 μ l之萃取緩衝液(Solution R)及150 μ l之phenol之微量離心管中，經激烈振盪(vortex) 30秒後，再加入250 μ l之chloroform/isoamyl alcohol (24:1)並再經激烈振盪30秒後，以14000 rpm離心5分鐘後取上層液加入等體積之5 M LiCl，於冰上靜置3小時後，以14000 rpm離心15分鐘，去除上清液後加入100 μ l 0.3 M NaOAc將沉澱均勻懸浮，再加入250 μ l 絕對酒精進行酒精沈澱，於-80°C冰箱靜置至少20分鐘，再以14000 rpm離心15分鐘，可得總量RNA (total RNA)沉澱，再以30 μ l DEPC處理過之無菌水溶解總量RNA後置於-80°C備用。

- 2.1.2 取總量RNA 2 μ l、下游股引子gL3637 2 μ l、DEPC-treated water 12 μ l，混和均勻後，略加短暫離心(spin down)，以80~90 $^{\circ}$ C熱處理5分鐘後，置於冰上5分鐘。
- 2.1.3 加入M-MLV reverse transcriptase 1 μ l、10X reverse transcription buffer 2.5 μ l、2.5 mM dNTP mixture 2 μ l、0.1M DTT 3 μ l、RNasin 0.5 μ l，使總體積為25 μ l；混和均勻後，略加短暫離心(spin down)。
- 2.1.4 於42 $^{\circ}$ C 30分鐘及37 $^{\circ}$ C 30分鐘的條件下進行第一股cDNA之合成反應。
- 2.1.5 取2.1.4之cDNA 4.5 μ l、上游股引子gL4435c或gL4510c 1 μ l、下游股引子 gL3637 1 μ l、Taq DNA polymerase 0.5 μ l、10X Taq reaction buffer 10 μ l、2.5 mM dNTP mixture 2 μ l、無菌水 81 μ l，使總體積為100 μ l；混和均勻後，略加短暫離心(spin down)。
- 2.1.6 PCR反應條件：首先於93 $^{\circ}$ C變性(denature)反應5分鐘後，再進行34個循環反應，每一循環反應之程序為93 $^{\circ}$ C變性反應1分鐘，50 $^{\circ}$ C黏合(annealing)反應1分鐘，72 $^{\circ}$ C聚合反應2分鐘，最後再於72 $^{\circ}$ C進行延長(extension)聚合反應10分鐘。
- 2.1.7 每一個PCR反應後產物樣品取10 μ l加入2 μ l之 6X loading dye，於0.8%瓊脂膠體電泳，在呈裝1X TAE緩衝液之水平式電泳槽中，以100 V (伏特)進行電泳分析50分鐘。
- 2.1.8 電泳完成後，將電泳膠片置於電泳照相系統箱內作紫外光照射觀察。

3. 結果判讀

- 3.1 在電泳照相系統顯示的螢幕上觀察比對健株及疑似罹病株，是否有預期約0.81 kbp及/或0.89 kbp大小之核酸片段條帶出現，若有則判定為正反應，若無任何條帶出現，則判定為負反應。此簡

併式引子對某些tosspovirus可能不會增幅出上述預期大小DNA片段，例如對另一未知其L RNA核酸序列的花生黃化扇斑病毒 (*Peanut chlorotic fan-spot virus*, PCFV)則增幅出0.38 kbp及0.46 kbp DNA 片段 (圖二)。

- 3.2 RT-PCR產物之DNA片段可進一步進行基因選殖、定序及序列比對，以確定其為何種*Tospovirus*。

引用文獻

1. 柯南靖。1989。簡易植物病毒診斷圖鑑。台灣省政府農林廳補助出版。南投縣，109頁。
2. 張清安。2001。蘭花病毒病。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出版。台北市，32頁。
3. Adam, G., Lesemann, D. E., and Vetter, H. J. 1991. Monoclonal antibodies against tomato spotted wilt virus: characterization and application. *Ann. Appl. Biol.* 118: 87-104.
4. Adam, G., Yeh, S. D., Reddy, D. V. R., and Green, S. K. 1993. Serological comparison of tospovirus isolates from Taiwan and India with impatiens necrotic spot virus and different tomato spotted wilt virus isolates. *Arch. Virol.* 130: 237-250.
5. Chang, M. U., Arai, K., Doi, Y., and Yora, K. 1976. Morphology and intracellular appearance of orchid fleck virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 42:156-157.
6. Chen C. C., and Shy, F., Ko, W. F., and Chiu, R. 1993. Identification of tomato spotted wilt-like virus on peanut in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 2: 251.
7. Chen, C. C., Ho, H. M., Chang, T. F., Chao, C. H., and Yeh, S. D. 1995. Characterization of a tospovirus-like virus isolated from wax gourd. *Plant Prot. Bull.* 37: 117-131.

8. Chen, C. C., Ko, W. F., Zheng, Y. X., and Jan, F. J. 2003. Isolation of a tospovirus causing chlorotic and necrosis spots symptoms on moth orchids (*Phalaenopsis* spp.). *Plant Pathol. Bull.* 12: 293.
9. Chu, F. H., and Yeh, S. D. 1998. Comparison of replication forms and ambisense M RNA of watermelon silver mottle virus with other tospoviruses. *Phytopathology* 88: 351-358.
10. Chu, F. H., Chao, C. H., Chung, M. H., Chen, C. C., and Yeh, S. D. 2001. Completion of the genome sequence of *Watermelon silver mottle virus* and utilization of degenerate primers for detection tospoviruses in five serogroups. *Phytopathology* 91: 361-368.
11. Chu, F. H., Cho, C. H., Peng, Y. C., Lin, S. S., Chen, C. C., and Yeh, S. D. 2001. Serological and molecular characterization of *Peanut chlorotic fanspot virus*, a new species of the genus *Tospovirus*. *Phytopathology* 91: 856-863.
12. Corbett, M. K. 1967. Some distinguishing characteristics of the orchid strain of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 57:164-172.
13. de Avila, A. C., de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., Goidbach, R. W., and Peters, D. 1993. Classification of tospovirus based on phylogeny of nucleoprotein gene sequence. *J. Gen. Virol.* 74: 153-159.
14. de Avila, A. C., Huguenot, C., Resende, R. de O. Resende, R., Kitakima, E. W., Goldbach, R., and Peters, D. 1990. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 71: 2801-2827.
15. de Haan P., Wagemakers, L., Peters, D., and Goldbach, R. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambi-sense character. *J. Gen. Virol.* 71: 1001-1007.
16. de Haan, P., Avila, A. C., Kormelink, R., Westerbroek, A., Gielen, J. J. L., Peters, D., and Goldbach, R. 1992. The nucleotide sequence of the S RNA of impatiens necrotic spot virus, a novel tospovirus. *FEBS L.* 306: 27-32.
17. de Haan, P., Kormelink, R., de O. Resende, R., van Poelwijk, F., Peters,

- D., and Goldbach, R. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 71: 2207-2216.
18. Doi, Y., Chang, M. U., and Yora, K. 1977. Orchid fleck virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 183.
 19. Elliott, R. M. 1990. Molecular biology of the *Bunyaviridae*. *J. Gen. Virol.* 71:501-522.
 20. Francki, R. I. B. 1970. Cymbidium mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 27.
 21. German, T. L., Ullman, D. E., and Moyer, J. W. 1992. Tospoviruses: Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 315-348.
 22. Goff, L. M., and Corbett, M. K. 1977. Association of tomato ringspot virus with a chlorotic leaf streak of *Cymbidium* orchids. *Phytopathology* 67:1096-1100.
 23. Gowda, S., Satyanarayana, T., Naidu, R. A., Mushegian, A., Dawson, W. O., and Reddy, D. V. R. 1998. Characterization of the large (L) RNA of peanut bud necrosis tospovirus. *Arch. Virol.* 143: 2381-2390.
 24. Green, S., and Chou, J. C. 1991. Identification of the watermelon isolate of tomato spotted wilt virus from tomato in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 33: 424.
 25. Heinze, C., Maiss, E., Adam, G., and Casper, R. 1995. The complete nucleotide sequence of the S RNA of a new *Tospovirus* species, representing serogroup IV. *Phytopathology* 85: 683-690.
 26. Hollings, M., and Stone, O. M. 1977. Cymbidium ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 178.
 27. Hu, J. S., Wang, M., Ferreira, S., and Ogata, D. 1992. Tomato spotted wilt virus on *Oncidium* orchids in Hawaii. *Plant Dis.* 76: 426.
 28. Ie, T. S. 1970. Tomato spotted wilt virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 39.
 29. Inouye, N. 1969. Cucumber mosaic virus isolated from *Dendrobium*. *Agric. Res.* 53:49-60.

30. Inouye, N. 1973. A new virus isolated from *Dendrobium*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 39:367-368.
31. Inouye, N., Maeda, T., and Mistsuhata, K. 1988. A strain of clover yellow vein virus isolated from *Calanthe* sp. *Acta Hortic.* 234:61-68.
32. Iwaki, M., Honda, Y., Hanada, K., and Tochiara, H. 1984. Silver mottle disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Dis.* 68: 1006-1008.
33. Jan, F.-J., Fagoaga, F., Pang, S.-Z, and Gonsalves, D. 2000. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *J. Gen. Virol.* 81: 2103-2109.
34. Jan, F. J., Chen, T. C., and Yeh, S. D. 2003. Occurrence, importance, taxonomy and control of thrips-borne tospoviruses, Pages 391-411 in: *Advances in Plant Disease Management. Research Signpost.* H. C. Huang and S. N. Acharya (eds.), Kerala, India.
35. Jensen, D. D., and Gold, H. A. 1951. A virus ring spot of *Odontoglossum* orchid : symptoms, transmission and electron microscopy. *Phytopathology* 41:648-653.
36. Ko, N. J. 1988. Cytological identification of *Cucumber mosaic virus* infecting *Phalaenopsis*. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. R. O. C.* 12:46-51.
37. Kormelink, R., de Haan, Meurs, C., Peters, D., and Goldbach, R. 1992. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segment. *J. Gen. Virol.* 73: 2795-2804.
38. Law, M. D., and Moyer, J. W. 1990. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *J. Gen. Virol.* 71: 933-938.
39. Law, M. D., Speck, J., and Moyer, J. W. 1991. Nucleotide sequence of the 3' noncoding region and N gene of the S RNA of a serologically distinct tospovirus. *J. Gen. Virol.* 72: 2597-2601.
40. Law, M. D., Speck, J., and Moyer, J. W. 1992. The M RNA of impatiens necrotic spot tospovirus (*Bunyaviridae*) has an ambisense

- genomic organization. *Virology*. 188: 732-741.
41. Lawson, R. H. and Brannigan, M. 1986. Virus disease of orchids. Pages 2-49 in: Handbook on orchid pests and disease. Am. Orchid Soc., West Palm Beach, Florida.
 42. Lawson, R. H. 1990. Orchid viruses and their control. Pages 66-101 in: Handbook on orchid pests and diseases. A. M. Pridgeon and L. L. Tillman (eds.), Am. Orchid Soc., West Palm Beach, Florida.
 43. Lawson, R. H., and Hsu, H. T. 1995. Orchid. Pages 409-420 in: Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops. G. Loebenstein, R. H. Lawson, and A. A. Brunt (eds), John Wiley & Sons, West Sussex, United Kingdom.
 44. Lesemann, D. E. 1977. Long, filamentous virus-like particles associated with vein necrosis of *Dendrobium phalaenopsis*. *Phytopathol. Z.* 71:257-269.
 45. Lesemann, D. E., and Koenig, R. 1985. Identification of bean yellow mosaic virus in *Masdevallia*. *Acta Hortic.* 164:347-354.
 46. Lesemann, D. E., and Vetten, H. J. 1985. The occurrence of tobacco rattle and turnip mosaic viruses in *Orchis* sp., and of an unidentified potyvirus in *Cypripedium calceolus*. *Acta Hortic.* 164:45-54.
 47. Lin, Y.-H., Chen, T.-C., Chung, M.-H., Chen, C.-C., Hsu, H.-T., and Yeh, S.-D. 2003. Serological and molecular characterization of calla lily chlorotic ringspot virus, a new species of the genus *Tospovirus* belonging to WSMoV serogroup. *Plant Pathol. Bull.* 12: 289.
 48. Milne, R. G. 1970. An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in sections of infected cells and in negative stain preparations. *J. Gen. Virol.* 6: 267-276.
 49. Moyer, J. W. 1999. Tospoviruses (*Bunyaviridae*). Pages 1803-1807 in: Encyclopedia of Virology. A. Granoff and R. G. Webster (eds.), Academic Press, New York.
 50. Murphy, F. A., Fauquet, C. M. and Bishop, D. H. L., Ohabrual., S. A., Jarvis, A. W., Martelli, O. P, Mayo, M. A., and Summers, M.D. 1995.

- Classification and Nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Arch. Virol. Suppl.10.
51. Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2: 279-290.
 52. Prins, M., and Goldbach, R. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. Trends. Microbiol. 6: 31-35.
 53. Reddy, D. V. R. and Wightman, J. A. 1988. Tomato spotted wilt virus: Thrips transmission and control. Adv. Dis. Vector Res. 5: 203-220.
 54. Sakimura, K. 1962. The present status of thrips-borne disease. Pages 33-40 in: Biological transmission of disease agents. K. Maramorocsh (ed.), Academic Press, New York.
 55. Satyanarayana, T., Gowda, S., Lakshminarayana Reddy, K., Mitchell, S. E., Dawson, W. O., and Reddy, D. V. R. 1998. Peanut yellow spot virus is a member of a new serogroup of *Tospovirus* genus based on small (S) RNA sequence and organization. Arch. Virol. 143: 353-364.
 56. Satyanarayana. T., Mitchell, S. B., Reddy, D. V. R., Brown, S., Kresovich, S., Jarret, R., Naidu, R. A., and Demski, J. W. 1996a. Peanut bud necrosis tospovirus S RNA: Complete nucleotide sequence, genome organization and homology to other tospoviruses. Arch. Virol. 141: 85-98.
 57. Satyanarayana. T., Mitchell, S. B., Reddy, D. V. R., Kresovich, S., Jarret, R., Naidu, R. A., Gowda, S., and Demski, J. W. 1996b. The complete nucleotide sequence and genome organization of the M RNA segment of peanut bud necrosis tospovirus and comparison with other tospoviruses. J. Gen. Virol. 77: 2347-2352.
 58. van den Hurk, J., Tas, P. W. L., and Peters, D. 1977. The ribonucleic acid of tomato spotted wilt virus. J. Gen. Virol. 36: 81-91.
 59. van Kammen, A., Henstra, S., and Le, T. S. 1966. Morphology of tomato spotted wilt virus. Virology 30: 574-577.

60. van Poelwijk, F., Prins, M., and Glodbach, R. 1997. Completion of the impatiens necrotic spot virus genome sequence and genetic comparison of the L proteins within the family Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* 78: 543-546.
61. Wijkamp, I., Vvan Lent, J., Kormelink, R., Goldbach, R., and Peters, D. 1993. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its vector, *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.* 74: 341-349.
62. Wisler, G. C., Zettler, F. W., and Mu, L. 1987. Virus infections of *Vanilla* and other orchids in French Polynesia. *Plant Dis.* 71:1125-1129.
63. Yeh, S. D., and Chang T. F. 1995. Nucleotide sequence of the N gene of watermelon silver mottle virus, a proposed new member of the genus *Tospovirus*. *Phytopathology* 85: 58-64.
64. Yeh, S. D., Chao, C. H., Cheng, Y. H. and Chen C. C. 1996a. Serological comparison of four distinct tospoviruses by ployclonal antibodies to purified nucleocapsid protein. *Acta Horticult.* 431: 122-134.
65. Yeh, S. D., Sun, I. J., Ho, H. M., and Chang T. F. 1996b. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the S RNA of watermelon silver mottle virus. *Acta Horticult.* 31: 244-260.
66. Yeh, S. D., Lin, Y. C., Cheng, Y. H., Jih, C. L., Chen, M. J., and Chen, C. C. 1992. Identification of tomato spotted wilt-like virus infecting watermelon in Taiwan. *Plant Dis.* 76: 835-840.
67. Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., and Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74:621-625.
68. Zheng, Y.-X., Yeh, S.-D., Chen, C.-C., and Jan, F.-J. 2003. Molecular cloning of a tospovirus infecting *Phalaenopsis* orchids in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 12: 303.