

植物檢疫病毒偵測技術

詹富智¹、盧耀村¹、陳慶忠²

¹國立中興大學植物病理學系、²行政院農委會台中區農業改良場

作物病害診斷通常以肉眼觀察病徵來加以判斷病害種類，但是由於病毒所引起的病害，其病徵變化極大，除其初期、中期與後期病徵皆有所不同外，又受季節及環境條件如日照、溫度、濕度、營養等因素的影響而有所不同。因此，由病毒所引起的病害所造成的病徵，除少數具有特異性徵兆外，大多數的病毒種類無法像真菌性及細菌性所引起的病害，它很難從外觀所呈現的病徵來診斷所感染的病毒種類。檢測人員除對檢測對象之病原基礎知識有所了解外，對於眾多的植物病原診斷方法也應有所選擇，但是要用在“檢疫”上，不管選用何種檢測方法，就要合乎(1)快速、(2)正確、(3)簡便三個要件。目前對於濾過性病毒之檢查能合乎上述三條件的檢測法，是以利用抗原與抗體相遇，能發生特異性吸附反應之所謂血清反應判斷法，最為快速、簡便、正確。惟至目前為止並非所有病毒皆有抗血清的完成，所以對尚未有抗血清可供診斷之病原檢測，則只能利用傳統簡便之指示植物生物接種法和組織化學染色診斷等，但是靈敏度並不高，對於初感染的病毒不易檢出，而且也需要熟練技術與經驗配合才正確。若檢測的對象是特定疫病蟲害，則需要利用靈敏度高之分子生物技術的反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)法或利用超高速離心機分離純化病毒，純化濃縮後再用電子顯微鏡鏡檢，若尚難判斷則必要將濃縮後試料事先經分子篩孔色層分析後，再電子顯微鏡觀察，就能容易判斷有無病毒存

不同濾過性病原所呈現的主要症狀：

1.菌質與螺旋質體(Phytoplasma and Spiroplasma)：

屬維管束病害，其病徵為易引起植株萎黃(Yellow)，心葉帶有紫色素(Purple-top)，葉變小簇葉(Witches' broom)，花器葉化(Phyllody)，芽肥大(Big bug)、葉白化(White leaf)，矮化(Dwarf or Stunt)等症狀。

2.病毒(Virus)：

病毒為害作物隨著病毒種類與為害部位的不同，所表現的病徵差異也大。大多數病毒群以在細胞質內危害增殖為最多，在維管束增殖者次多，如 Luteovirus 屬病毒，再次為細胞核內增殖的病毒，如 Geminivirus 等。由病毒所造成的病徵甚複雜，一般以系統性感染最普遍，所出現病徵主要有嵌紋(Mosaic)，而且依嵌紋型態之不同，常見者又可分為斑駁嵌紋(Mottling mosaic)，脈綠嵌紋(Vein banding mosaic)，漣葉嵌紋(Crinkle mosaic)，皺縮葉嵌紋(Rugose mosaic)，綠泡凸起嵌紋(Dark green island mosaic)等不同型態之嵌紋。此外，葉脈透化(Vein clearing)、條紋(Stripes or Streak)，條斑(Striate)、黃化(Yellow)，退綠(Chlorosis)，矮化(Dwarf or Stunt)，叢生(Rosette)，簇葉(Witches' broom)，絲狀葉(Fern leaf)，凸起(Enation)，畸形

(Marformation)，捲葉(Leafroll or Leaf curl)以及腫瘤(Tumour)等為多見。

引起局部症狀者有壞疽(Necrosis)，也屬於系統性感染之一種，輪點(Ring spot)，黃暈(Yellow blotch)以及斑點(Lesion)等。

除此之外，有些病毒感染作物後，寄主外觀並不表現出病徵(Symptoless)，且與健康者難以區別，稱之為潛伏性感染(Latent infection)，而造成潛伏感染的此類病毒，也可稱為潛居性病毒(Cryptovirus)，如馬鈴薯病毒 S 在克尼伯品種上之感染屬之。另外，某些病毒感染後，由於外界環境因素的影響，如高溫、低溫、日照或養份等因子，一度出現後又消失，恢復如同健康狀者，此種情況叫病徵隱避或病徵消失(Masking)，但病毒尚存在於作物體中，一但環境條件適合再出現病徵，惟植株已長大、營養條件又好，則病徵會比較輕微。

3.類病毒(Viroid)：

本病原在 1971 年後才證實存在並異於病毒，至今所發現的種類只有十幾種，病徵通常在高溫時才容易表現。所造成的病徵主要有：畸形皺縮(Epinasty)、心葉叢生(Bunchy-top)、退綠斑駁(Chlorotic mottle)、矮化(Stunt)、果實白化(Pale fruit)、塊莖瘦小(Spindle tuber)、鱗皮(Exocortis)、黃點(Yellow speckle)、日燒疤(Sun blotch)與果銹(Scar skin)等症狀。

診斷程序：

針對各種濾過性病毒所引起的病害，其診斷過程通常以肉眼觀察病徵的表現加以判斷，倘若尚難加以確定則在從簡單的解剖由內部症狀加以診斷，再無法確定就要靠專業的判別植物接種、嫁接、組織化學染色、血清反應與分離純化病毒再靠電子顯微鏡觀察加以論證。各項診斷方法簡述如下：

A. 肉眼判斷：

如前所述，由濾過性病原所引起的病害，除病徵表現較有特異性症狀者之種類，如：瓜類嵌紋病毒為害番茄所出現的絲狀葉，葡萄扇狀病毒所引起的扇狀葉，馬鈴薯 Y 病毒所引起的壞疽病斑，水稻的黃葉病、草狀矮化病、皺縮矮化病及菌質所引起的水稻的黃萎病，甘蔗白葉病，泡桐天狗巢病等等。除此之外大多數皆難從病徵確定其病原種類。

B. 解剖診斷：

有一些病徵在各種病原間皆有類同的病徵表現，因此就難以單從肉眼診斷確定。遇到此種情況，尚需要靠簡單的解剖，從內部症狀來區分。如馬鈴薯的捲葉病，造成捲葉得原因除由病毒所引起外，尚有真菌黑痣病引起的捲葉及生理性的捲葉等。要確定本病是否由病毒所造成的最簡單方法，就是橫切莖基部，觀察維管束部位若有褐化則為病毒所引起。此外，地上部心葉節間拉長，葉柄較直立並有紫色素出現或後期有中空塊莖出現，則為真菌 *Rhizoctonia* 所引起的黑痣病，若無則為生理性捲葉。

C. 嫁接診斷：

國外目前草莓繁殖苗診斷母本有否帶病毒常用的方法。本省草莓現今所採用的栽培品種，只要管理與營養狀況良好，生長期間皆看不出病徵表現，但往往會有病毒潛伏存在，而縮短採果期壽命。對於此類病毒的診斷，如草莓擬輕症葉緣黃化病毒(Strawberry pseudomild yellow edge virus)的病毒檢定，係利用由種子育苗而來的感病性品種 UC-1 或 EMC 為指示砧木，以葉接法嫁接栽培品種欲大量繁殖的母本枝葉，若母本帶有病毒，則砧木由心葉新長出來的葉片就會出現葉緣黃化的病徵，依此即可確定母本內有病毒潛伏存在。

D. 汁液接種診斷：

若經過肉眼及解剖診斷，尚難確定是否由病毒所引起的病害時，就需要專業的摩擦法汁液接種到判別植物上加以診斷。汁液接種看起很簡單，但是要達到正確診斷效果，就要考慮許多看不見的影響因素，如：所選用保護病毒的緩衝液種類、緩衝液的離子濃度、緩衝液的 pH 值、緩衝液的用量、判別植物的種類及齡期、金剛砂的粗細及用量、季節與光照、接種後的葉面濕度等因素，都會影響接種後的結果。若上述接種條件中有一項不利於病毒的因子需要，則即使在有病毒的狀況之下，也會因接種條件不適宜於病毒的侵入感染，而得到負(無病毒)的不正確結果。

各因素所需注意的要件簡述如下：

緩衝液的種類：

理論上酵素化學所用的緩衝液皆可適用在病毒的汁液接種診斷，但是事實上由於病毒種類之不同，對於緩衝液種類的性質需求也有所不同，而且對作物不同病毒種類的保護效果也不同。因此對特定種類的病毒診斷，除有先經過緩衝液的測試者外，通常皆選用磷酸緩衝液，因其對作物病毒的適應性較廣，所以作為研磨病材料的保護液最為普遍。

緩衝液離子濃度：

接著需考慮的問題是要用多少克分子量(Mole)濃度對病毒較安定，隨病毒種類之不同所需的克分子量濃度需求也有所不同，例如木瓜輪點病毒的接種，用磷酸緩衝液時以 0.025 克分子量濃度對木瓜苗較容易發病。若對特定的病毒接種，事先未加以測試，一般若用磷酸緩衝液研磨時，則以 0.1 M 濃度的使用較常見。

緩衝液的酸鹼度(pH 值)：

在 0.1 克分子量濃度的磷酸緩衝液下，不同酸鹼度對病毒的安定性也有所不同，例如 Brome mosaic virus 在 pH4-6 才容易汁液接種成功。但是絕大部分的作物病毒，在中性域附近，皆能汁液接種感染成功，所以在未事先測定最適 pH 值時，通常皆採用 pH7 附近的酸鹼度。

緩衝液用量：

要汁液接種成功，罹病材料要加入多少緩衝液量加以研磨才適合，也是一

不可忽視的重要條件。一般都認為加入的緩衝液量越少，相對汁液中病毒的濃度會越高，比較容易汁液接種成功。但事實上適相反，殊不知因罹病材料在研磨前，病毒是在生體內(in vivo)狀態和寄主成份保持正常狀況，一旦經研磨後，植物組織被破壞，變成生體外(in vitro)狀態，組織內所含的成份和病毒抑制成份皆活化，在緩衝液量不足下，保護病毒的緩衝能力不但降低，同時相對的多酚類氧化抑制病毒的濃度也變高，足使病毒無法侵入感染或導致不活化。所以在多酚類含量高的病組織，汁液接種時加入的緩衝液量就需要多，如此才容易接種成功。由經驗得知一般磷酸緩衝溶液的用量為罹病材料重量的 10 倍量(w/v)或以上，較能汁液接種感染成功。

判別植物的種類與齡期：

至於汁液接種用判別植物種類的決定，應由過去前人研究報告所得結果中篩選出判別植物。若難以得到此類報告，一般作物病毒容易在藜科植物接種葉上經過 4-10 天產生局部斑點，所以藜科植物常被選用為判別植物。另外加入原寄主植物及相近的一些植物做為汁液接種用之判別植物。至於判別植物的大小(齡期)與發病也相關，齡期愈大抗病性也較強，通常供診斷用的判別植物皆選用苗期 3-5 葉期較為適當。又接種的葉位以中下葉位比上位葉較容易感染，瓜類接種在子葉較本葉容易發病，而且能得到正確結果。

金鋼砂粗細與用量：

病毒通常要有微傷口才能附著侵入感染，所以汁液接種前，事先要在接種葉面散佈微量的金鋼砂，使摩擦接種時形成小傷口，讓含有病毒的汁液與之相接觸，以利於病毒附著在傷口造成感染。造成小傷口的金鋼砂粗細以 400-600 目(mesh)為宜，太粗的金鋼砂所造成的傷口，反而使病毒難以侵入感染。至於散佈在葉面上金鋼砂的用量，愈少愈有利於病毒的感染，過多反而因葉面上的金鋼砂會吸附病毒粒子，反使感染率降低，甚至於無法感染成功。接種後立即以自來水沖洗葉面將緩衝液鹽類及金鋼砂洗除，以免因水份蒸發後使緩衝液鹽類濃度升高而將細胞水份反滲透造成葉片萎凋而無法感染。

季節與光照：

病毒的發生隨著病毒種類的不同，各有其發生的適宜季節，即有些病毒在夏季比較容易發生，另一些病毒則在低溫的冬季才發生。因此診斷時應配合病毒發生的條件下進行接種，如此接種診斷才可靠。例如馬鈴薯的病毒在台灣較屬於低溫型病毒，應在秋冬季進行診斷才正確。像 PVX 接種在千日紅上會產生局部病斑，但在晚春以後溫度若超過 25 °C 則斑點不會出現。又如類病毒的汁液接種診斷，在 28 °C 以上時病徵才會出現，若在秋冬季診斷則完全不表現病徵。其他如菌質引起的病害，以嫁接法診斷，在冬季無法表現病徵，但在春夏季嫁接就能出現病徵。至於光照方面，汁液接種後之判別植物應置於陰涼處一天，不能直接照射陽光，否則紫外線會破壞病毒的感染。

接種葉面濕度：

汁液接種診斷，除了金鋼砂不能散佈太多及摩擦時不能太用力使造成大傷

口，或摩擦過輕無法形成小傷口之外，另一重要的事項是摩擦接種後的葉面最忌呈乾燥狀，而無病汁液存在，且要在數分鐘內水洗，不能讓接種汁液在葉面上乾枯，否則病毒無法感染成功，並且水洗後能讓葉面保水份或濕氣一段時間，此種接種診斷最正確。

E. 組織化學染色診斷：

作物受病毒感染，到中後期以後會作物體內形成特有形態的封入體(Inclusion body)，因此只要撕下被檢體的表皮，經過 Calcomine orange 與 Luxol brilliant green 混合液的蛋白染色或紫紅核酸染劑(Azure A)的核蛋白染色後，再用酒精脫色移入 2-methoxyethyl acetate 處理，封片於載玻片上，在光學顯微鏡高倍率下觀察，若有封入體存在，便是受病毒感染。依照理論與觀察經驗，得知也可從封入體的構造、形態、顏色、位置，形狀與大小，來判定其為害病毒種類。詳細請參閱：G. Christie 與 J. R. Edwardson(1974) Light and electron microscopy of plant virus inclusions.或柯南靖(1989)簡易植物病毒診斷圖鑑。

F. 血清學診斷：

若能製備或購買到各種作物病害的抗血清，則能利用抗血清中的抗體 IgG 能和原來產生抗體抗原(病原)發生特異性反應的原理，就能快速簡便偵測到有否病原之存在，但是抗原抗體的反應操作，得符合血清學原理才能得到正確的反應結果，否則也會發生錯誤的假陽性或假陰性反應。

血清診斷的應用，依檢查目的的不同也多元抗體(Polyclonal antibody)與單元抗體(Monoclonal antibody)之分，多元抗體對偵測有否病原的存在較有利，有如散彈槍，單元抗體則對病原種類之差異鑑定較為有利，有如單發槍，而一般針對未經純化材料的血清反應的偵測方法甚多，較常用的簡述如下：

(甲) 多元抗體(Polyclonal antibody)

多元抗體及傳統所說的抗血清，係已純化後的病原為抗原，免疫注射至動物，而病原上所具有的多數抗原決定基(Epitope)，在生體內針對每一抗原決定基能產生其相對應的一種抗體，如此所得之抗血清中就含有各不同抗原決定基所產生的抗體存在，所以稱之為多元抗體。

多元抗體常用來做一般經常性的檢疫，及由生長點組織培養體而來的健康苗木培養體是否尚有病原存在的檢查上，常用的方法有：

a. 載玻片凝聚反應(Slide flocculation test)：

將被檢體擠壓枝液一小滴於載玻片上，然後滴上一小滴經生理食鹽水稀釋後之血清，使混合，同時作一對照組，經 5-10 分鐘內利用擴大鏡觀察，有否抗原抗體所反應的浮游凝聚物產生即可知曉。為血清反應方法中最簡便的方法，惟靈敏度不甚高，對初期感染者不易偵測。

b. 微滴法(Microprecipitin test)：

先在培養皿上倒入聚乙烯醇縮甲醛液形成一層疏水性膜後，放在事先畫有

方格的紙上，每一小方格滴一小滴被檢體後再滴入一小滴抗血清進行反應。若被檢體數目多，為避免時間長而小液滴蒸發而乾涸，可沿皿壁倒入透明的純礦物油覆蓋，以防止水份蒸散，然後於解剖顯微鏡下觀察是否有凝聚物產生。本法優點在於小面積內就可檢查多量的樣品，但是同樣對初期感染病毒者較難偵測到。

c. 人工乳膠凝聚反應法(Latex aggrutination test)：

將血清抗體 IgG 事先吸附在 0.8 um 人工乳膠粒子上，然後依上述的方法進行抗原抗體反應。本法對於病原濃度尚低時所發生的微量抗原抗體反應，因抗體上有人工乳膠粒子吸附，所以只要有抗原抗體發生反應，較容易用肉眼看到凝聚物發生，因而比較容易診斷，所以能提高診斷的靈敏度。

d. 雙擴散反應法(Double diffusion test)也稱 Ouchterlony 法：

在 9 公分的培養皿內，測水平後倒入 0.7-1%的純瓊脂溶液 10~12 毫升，做成瓊脂平板，凝固後做六等邊等間距的小穴，中央穴放入抗血清，周圍穴放入被檢體汁液，經 6-48 小時的擴散，在抗原與抗體相互擴散相遇處會形成白色的反應帶，若無相對病原存在則無反應帶出現。本法雖然反應靈敏度不高，但由反應帶出現的位置、數目及反應帶相互間有否交錯，可以判知不同被檢體彼此間分子量的大小與抗原(病原)相互間的異同，甚至於抗血清的純度等。

e. 酵素連結抗體法(ELISA=Enzyme linked immunosorbent assay)：

首先將抗血清中之主要抗體 IgG 純化出來，利用戊二醛本身所具的醛基容易和氨基發生連結的性質形成酵素連結抗體，或利用過碘酸鈉先將含有五碳糖酵素氧化形成醛基後再和抗體的氨基連接形成酵素連結抗體，或將純化後的抗體 IgG 先以胃蛋白酵素分解去除抗體 Fc 非特異附著部位後，所得抗體(Fab')₂ 片段所持有的-SH 基，再利用馬來醯亞胺或二硫化吡啶基和含有-SH 基的酵素連結而得到酵素連結抗體。利用 ELISA 診斷有許多檢查的方法，在偵測已未經純化之材料為被檢體時，常用的基本檢查法是雙抗體包夾法(Double antibody sandwich ELISA)最為普遍，其檢查過程簡述如下：

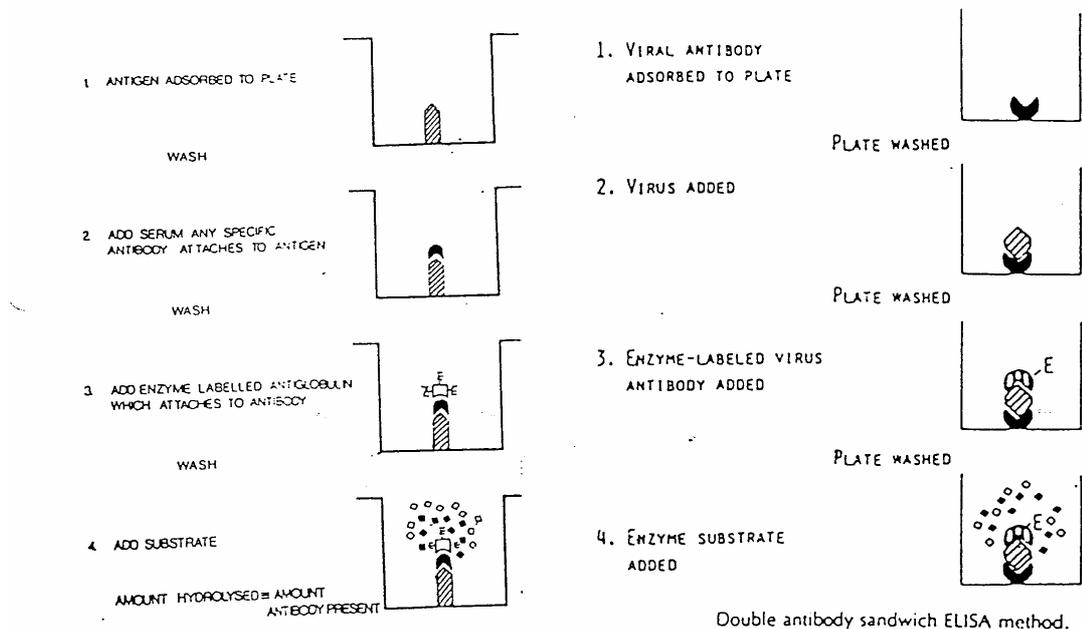
- 1 首先將已知抗體吸附在 96 穴檢查盤
37 °C 下反應 1-2 hr 或室溫反應 4-6 小時或 4 °C 下隔夜
↓
- 2 以洗滌液洗滌後
↓
- 3 各穴放入各種被檢體，
37 °C 下反應 1-2 hr 或室溫反應 4-6 小時或 4 °C 下隔夜
↓
- 4 再以洗滌液洗滌
↓
- 5 各穴加入稀釋後的酵素連結抗體，

37 °C 下反應 1-2 hr 或室溫反應 4-6 小時或 4 °C 下隔夜

- ↓
- 6 再以洗滌液洗滌
- ↓
- 7 加入酵素基質，室溫下反應 15-60 分鐘
- ↓
- 8 反應完全後，加入 3 N 的 NaOH 溶液停止反應

若被檢體內有抗原(病原)存在，雖然以肉眼無法觀察到的微弱抗體抗原反應發生，由於抗體上連有酵素，而酵素遇到其基質則會反應呈色的原理，也就容易用肉眼從酵素的呈色而得知有抗原(病原)的存在。

上述過程中之酵素連結抗體，係連結在一次抗體上，若連結在二次抗體(即以兔子免疫注射而來之抗體為抗原，再免疫注射至不同動物如羊所產生之抗體謂之二次抗體)上，則所得之酵素連結抗體，以後檢查時只要是由兔子而來之不同種類抗血清，該連結抗體皆可共用。需要檢查的病毒種類多時較方便，有人稱之謂 Indirect ELISA，惟靈敏度及特異性反應較連結在一次抗體的 Direct ELISA 為低。



抗原直接覆被 + 直接法

(乙) 單元抗體(Monoclonal antibody)：

所謂單元抗體簡言之是由一個抗原決定基(Epitope=antigen determine side)所產生出來的抗體叫單元抗體，首先要以病毒為抗原免疫注射至白鼠，然後取出脾臟並分離出脾臟細胞(Spleen cell)和事先培養準備好得骨髓腫瘤細胞(Myeloma cell)培養融合，在選擇性培養基培養下，篩選出脾臟細胞和骨髓腫瘤細胞互相融合的細

胞，此種細胞叫融合瘤(Hybridoma)。所得的融合瘤經過單一融合瘤細胞篩選培養，如此所產生出來的抗體叫單元抗體，又經過反應鑑定該單元抗體反應性質後，便可靠繼代培養源源生產此單元抗體以供使用。

單元抗體通常在診斷中主要用在多元抗體反應中，因發生交叉反應，而無法區別兩病毒間的差異，而需要進一步加以區分時，最能發揮其效用，或者需要直接診斷特定病原種類時才能顯現其特有功能。但對於其他類緣病毒的感染或複合感染，就無法能同時檢出其他病原的存在，所以在一般性的診斷或在生長點培養的種原、健康種苗、繁殖用的母本、接穗等等的病毒檢查難以發揮其效用，還是用多元抗體較為有利。

由於單元抗體在抗原抗體反應中只有初級反應(Primary reaction)，無二級反應(Secondary reaction)的存在，所以反應後不會有沉澱產生，因此使用單元抗體的檢查，只能用上述酵素連接抗體的診斷方法加以進行。

G. 組織切痕轉印(Direct tissue blotting)

本法是一種抗原抗體反應檢查的簡化檢查方法，可惜對於病毒不容易析出或維管束內增殖或核內存在之病毒則不容易正確檢查出來，其方法是將被檢體葉片先捲成筒狀，刀片橫切或葉柄，莖，根橫切，所得新鮮切面之即壓印在硝酸纖維膜上，以含 2%牛血清白蛋白及 0.85%氯化鈉之磷酸鈉緩衝液清洗一小時後，再添加適當稀釋(最適比)之抗血清，反應二小時，再用含有一滴 Tween-20 之磷酸生理食鹽水緩衝液清洗，最後添加酵素連結抗體反應二小時，同樣也清洗後，浸入酵素基質溶液，若有呈色則為陽性反應表示有病毒存在。

H. 螢光抗體法：

主要用於診斷病原在組織體內所分佈存在的部位時採用的方法之一，首先將抗體 IgG 純化出來，再濃度 0.5 M 碳酸緩衝溶液 pH9.5 下將抗體標誌上螢光色素，經 Sephadex G25 去除游離色素後，再經 DEAE-cellulose 排除非特異反應以後，所得者即為螢光抗體。檢查時將被檢體包埋切片或徒手切片，保濕箱內滴上螢光抗體反應 30 分鐘，生理食鹽水清洗後便可封片，在螢光顯微鏡下觀察，在有病原存在之部位於 UV 光波下便有特異螢光出現，由此便可知病原存在之位置。

I. 電子顯微鏡鏡檢：

本法最大的優點是可以用肉眼直接看到病毒的存在及尚可了解病毒的粒子形態及大小，唯其缺點是看不到病毒的存在不一定是無病毒，其在診斷上常用的方法有：

1. 直接陰染法(Direct negative staining)

被檢體先以刀片切成細碎片放入一小滴緩衝液中，使病毒從病組織中游離出來，將被覆 formal 薄膜銅網(grid)沾上此液，置於保濕的培養皿中 2-3 分鐘用濾紙細片吸去多餘汁液，再滴一滴 2%的醋酸鈾(Uranyl acetate)或磷酸鎢

(Phosphotungstic acid)溶液，同樣吸去多餘汁液後，便可在電子顯微鏡下觀察是否有病毒之存在。

本法對絲狀病毒較容易觀察，對於小球形的病毒，則由於未經純化含有許多植物成份在內不容易區分病毒，且對不容易游離而出的病毒也難以鏡檢觀察到病毒。

2. 病毒純化濃縮後的鏡檢

罹病材料以適合緩衝液研磨，濾過汁液先用有機溶媒處理，再經低速離心除去植物正常蛋白後，去淨化後的上澄液，再利用超高速離心機交互離心，最後所得的病毒沉澱濃縮後，再利用梯度密度離心法，或分子篩孔色層分析法將病毒純化濃縮，所得試料再以上述陰染法或真空人工造影後，經電子顯微鏡觀察。

本法因經過純化濃縮，所以不同種類病毒粒子皆比較容易觀察，唯對於有機溶媒處理，病毒易分解者，即不容易純化的病毒，診斷較不容易。

J. 利用分子生物技術之反轉錄聚合酶反應(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)診斷

聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction)是一種廣泛應用於短時間內大量複製某一特定目標核酸片段的技術，將一核酸做為模板(Template)，加上利用目標核酸片段上下游序列所設計而合成的一小段長約十至數十個鹼基之寡核苷酸做為引子(Primer)，利用耐高溫的 DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)，於引子交夾處合成一段 DNA，由於此酵素耐高溫，故可於反覆「高溫變性(Denature)、低溫鏈合(Annealing)、核酸合成(Synthesis)」之程式溫度控制儀(Programmable thermocycler，俗稱 PCR machine)中，以等比級數之速度於短時間內快速增幅(Amplify)目標核酸序列。然後再利用電泳法(主要是 Agarose gel electrophoresis)將複製之核酸片段加以分析。由於在設計引子對時即已掌握該段標的核酸片段的分子量大小，因此由電泳分析結果即可由是否出現與預測大小相符之核酸片段，判斷是否為病毒感染之植株。此偵測法之靈敏度(Sensitivity)是所有已知病毒檢定方法中最高者。但是也由於此一偵測技術極端敏感，故操作時稍一不慎，即可能造成污染而得到假正值(False positive)而引起誤判。因此應用此技術時適當的負對照組(Negative control)一定要包含在每次操作中。

因為大部份的植物病毒為 RNA 病毒，因此須先將植物病毒的 RNA 以反轉錄酶(Reverse transcriptase)合成互補 DNA(cDNA)，然後來再利用 PCR 的原理來大量增幅這段 cDNA，此技術即稱為反轉錄-聚合酶連鎖反應(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)。常用的反轉錄酶有 AMV(Avian Myeloblastosis Virus)反轉錄酶及 M-MuLV(Moloney Murine Leukemia Virus)反轉錄酶。M-MuLV 反轉錄酶的 RNase H 的活性比 AMV 反轉錄酶低，因此相對可反轉錄較好。隨著植物病毒核酸序列的大量被解析出，PCR 及 RT-PCR 已被證實為強而有效的病毒檢定方式。利用簡併式引子對(degenerate primer)或病毒屬專一性引子對

(genus specific primer)，可快速廣泛偵測及檢定某一屬或群病毒。而利用病毒種或系統專一性引子對(species or strain specific primer)，可以快速鑑別特別種或系統之存在。

K. 利用分子生物技術之生物晶片(Biochips)診斷

生物晶片 (Biochips) 是指將生物有關的大分子如 DNA、Oligonucleotide、蛋白質等利用微電子，微機械等工業技術以微面積、高密度方式精確點製在如玻璃片或尼龍 (Nylon) 膜上，用於生物化學分析等之檢測及基礎研究，這種高密度整齊排列的晶片又稱為微陣列技術 (microarrays)，目前發展最成熟的是基因晶片 (gene chips; DNA chips; Oligonucleotide-chips)。生物晶片技術的主要特點是分析可信度及精確性高、分析速度快、所使用的樣品及試劑少，並且一片生物晶片上含有上千至萬的基因樣點，並且目前的方法容許偵測到一個細胞內少數幾個訊息 RNA 改變，因此，只需一次的實驗，cDNA 微陣列能夠將成千上萬的基因表現的樣式記錄下來。用於病原偵測，則可測成千上萬個不同的病原，因此可為一個有效的檢疫偵測工具。植物病原，尤其是植物病毒及多種重要病原真菌及細菌的全長度核酸或部分序列已經發表，因此利用生物晶片做為植物病原甚至於動物及人類的病原的檢疫偵測，將可收事半功倍的效果及亦為一種靈敏而準確之工具。

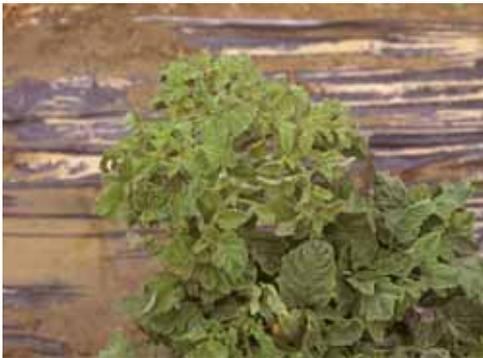
結語

隨著台灣即將加入 WTO，經濟腳步更加自由化以後，在國際間種苗、種子交易越趨頻繁，檢疫工作則愈形重要且困難，如何利用適當的檢測工具快速而準確檢測植物病毒為吾人所須努力。各種檢測方法，包括從生物分析法至 RT-PCR 或者最近正如火如荼發展的生物晶片(Biochips，DNA chips)均是有它的價值，然而如何選擇能達成檢疫目的又能節省人力、物力、時間等的技術，則為為我們每個從事植物病毒檢測及研究人員所需仔細思考的問題。

蕃茄病害



1.黃化矮化壞死
由番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 所引起



2.縮葉嵌紋，新葉皺縮生長停止
由 giminivirus 病毒與其他病毒複合感染



3.果肉褐化、皺葉
由蕃茄無子病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV) 所引起

馬鈴薯病害



4.微嵌紋

由馬鈴薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 感染所引起



1.漣葉嵌紋

由 PVX 與馬鈴薯 S 病毒 (*Potato virus S*, PVS) 複合感染所引起



2.嚴重型漣葉嵌紋

由 PVX 與 PVY 病毒複合感染所引起



5.黃化嵌紋

由馬鈴薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 感染所引起



3.嵌紋

由 PVY 嵌紋系統 (mosaic strain) 所引起



4.壞疽
由PVY 壞疽系統 (necrosis strain)
所引起



7.生理黃化
葉鮮黃不脫落，根蚜寄生所造成



5.黃化
由PVY 黃化系統 (chlorotic
strain) 所引起



8.生理黃化
土壤中除草劑殘留所造成



6.皺葉嵌紋
由多種病毒複合感染所引起，只
發生在自留種薯栽培



9.心葉畸形
非由菌質所引起簇葉病，係薊馬危害所造
成



10.葉銹斑壞死
非由 PVY 壞疽系統所引起，由
細蟎危害所造成

草莓病害



1.草莓潛伏性病毒 *Strawberry latent virus*
專由昆蟲媒介小球形病毒所引起



11.生理捲葉
非由 *Potato leafroll virus* 所引起



2.葉緣黃化
生理性病害，非國外報告之 *Strawberry mild yellow edge virus* 或 *Strawberry vein banding virus*

甜椒病害



1.花葉嵌紋

田間由數種病毒重複感染所造成，主要有 PVX、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、番茄無子病毒(TAV) 及 PYV 群(科)等感染所引起



2.黃化嵌紋

主要由 CMV 及番茄無子病毒(TAV) 感染所造成



3.微嵌紋

由番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)所引起，若與 CMV 再感染造成黃化皺葉



4.黃斑嵌紋

由馬鈴薯 X 病毒 (PVX) 感染所造成，嚴重時葉發生壞疽

洋桔梗病毒病害



1. 胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

罹病株呈系統性感染，植株明顯矮化，矮化程度與感染時植株大小有關。罹病植株葉片產生黃化嵌紋病徵 (A)。部份罹病株葉片明顯變小並有皺縮之視象



2. 蕪菁嵌紋病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)

田間罹病洋桔梗植株發病初期葉片出現黃化圓形輪斑，周圍則呈曇狀黃化現象（A）罹病株呈系統性感染，植株明顯矮化，葉片變小。後期整個病斑轉變成壞疽斑，斑點周圍呈水浸狀（B）。



3. 番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)

植株矮化、黃化斑駁、嵌紋（A,B）或黃化斑點（C）



4. 蠶豆萎凋病毒 (*Broad bean wilt virus, BBWV*)

田間自然發病之洋桔梗呈全株系統性感染，發病初期於葉片出現暈狀黃化斑點，隨著病勢進展罹病葉片出現多輪環斑或黃化斑點。



5. 洋桔梗壞疽病毒 (*Lisianthus necrotic virus, LNV*)

田間自然感染 LNV 之洋桔梗發病初期於上位葉片出現許多淡黃色圓斑並逐漸轉化成壞疽斑點，偶也會出現輪圈狀的斑點，有時鄰近許多斑點融合成斑塊甚至導致被害葉萎凋或葉頂枯死。類似的病徵也在發病嚴重之植株的花梗和花莖出現。罹病植株開花受到抑制，花呈畸形，或花瓣出現褪色狀條紋。

康乃馨病毒



1. 康乃馨斑駁病毒 (*Carnation mottle virus, CarMV*)

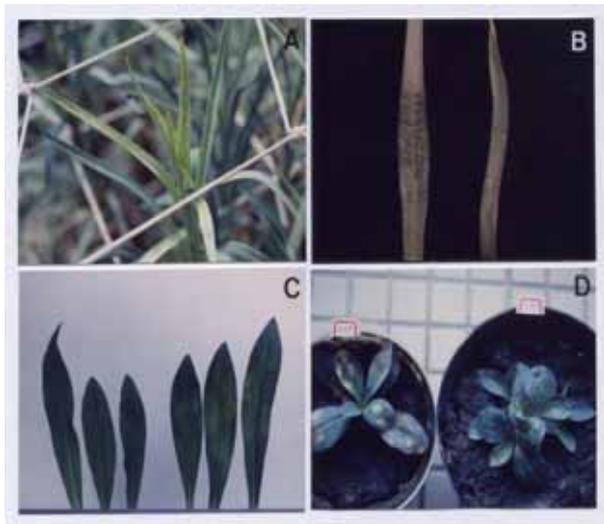
室內以康乃馨機械接種 CarMV，接種葉產生黃化斑點，葉緣並有內捲現象 (A)。田間罹病株葉片產生黃化壞疽斑點、沿中肋形成黃化斑駁條紋等病徵之植株，隨病勢進展許多鄰近斑點融合成斑塊，甚至全葉性枯萎 (B)。

海芋病毒



1. 康乃馨斑駁病毒 (*Carnation mottle virus, CarMV*) - CarMV 回接海芋產生黃化斑駁及黃化斑點。

田間海芋感染 CarMV 產生黃化斑駁病徵 (A)，田間海芋感染 CarMV 產生黃化環圈 (B)。



3. 洋桔梗壞疽病毒 (*Lisianthus necrotic virus, LNV*)

罹病康乃馨葉片產生黃化斑點 (A)，機械接種康乃馨葉片產生黃化壞疽斑點 (B)，機械接種五彩石竹產生黃化斑點 (C)，機械接種洋桔梗產生黃化壞疽斑點。