

植物雙生病毒診斷技術暨病毒診斷試劑套組之實務操作

胡仲祺¹、楊素華¹、陳信宏²

¹國立中興大學 生物科技學研究所、²高容生物科技股份有限公司

由粉蝨(*Bemisia tabaci*)傳播而感染雙子葉植物之雙生病毒屬(The genus *Begonovirus*)之病毒可危害 40 種以上蔬菜和纖維作物，發生嚴重時可完全摧毀作物的生產，此病害的發生由熱帶地區逐漸擴展至亞熱帶及溫帶，已成全球性的重要植物性病毒病原。此病害伴隨著它的媒介昆蟲粉蝨類，逐漸適應台灣地區的農作物生態，發作密度日漸升高。在台灣地區已有數種作物及雜草發生類似雙生病毒感染，並在近期於中、南部及花東地區番茄上造成捲葉病的肆虐，使得番茄幾無收成，故雙生病毒亦已成為台灣地區主要作物病原之一。而為因應我國加入世貿組織(WTO)後外國農產品進口防疫檢疫工作之需求，並累積貿易談判籌碼，實應建立台灣地區雙生病毒快速診斷方法，以利各項工作之推行。

由粉蝨傳播之菸草捲葉病害及樹薯嵌紋病害，在 1930 年代已被報導(Brown and Bird, 1992)，但其雙生病毒病原直到 1978 年才被國際病毒分類委員會承認，分類的根據是這類病毒的兩種特性，一是型態，雙生病毒是由兩個 T=1 的二十面體組成雙生粒子，大小約為 18x30 nm；二是病毒包含單股環狀 DNA 基因體(Mathews, 1979)。目前雙生病毒已被承認為一個科：雙生病毒科(*Geminiviridae*)，其中的雙生病毒依照它的基因體組成、寄主範圍及媒介昆蟲區分成四個屬(*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus*, *Topocovirus*)：

Mastrevirus 及 *Curtovirus* 具有單一條環狀單股 DNA(monopartite)，均由浮塵子傳播，此二屬的區別在於寄主範圍，*Mastrevirus* 屬之寄主為單子葉植物，而 *Curtovirus* 寄主為雙子葉植物。第三屬 *Begomovirus* (豆類金黃嵌紋病毒屬)具有二條環狀單股 DNA(bipartite)，媒介昆蟲為粉蝨，其寄主範圍為雙子葉植物，但近年此屬的病毒也有發現具單一基因體的(Navot et al., 1991)，而目前在大部分農作物上危害最嚴重的即為 *Begomovirus* 的病毒。此外，在雙子葉植物上最近又有第四屬 *Topocovirus* 被承認，其不同之處在於傳播媒介為 treehoppers(蟬類)，且僅具有單一基因體。而因目前台灣地區最嚴重的雙生病毒病害大都在雙子葉植物上，本次研討會僅以豆類金黃嵌紋病毒屬之雙生病毒及其引發之植物病害作為介紹。

豆類金黃嵌紋病毒屬的病毒為可感染雙子葉植物、且由粉蝨傳播雙生病毒，現在已知其基因體有單一DNA(單基因體)或二條單股環狀DNA(雙基因體)。單一DNA基因體的豆類金黃嵌紋病毒，如番茄黃化捲葉病毒 (Navot et al., 1991, Rochester et al., 1994;

Briddon and Markham, 1995)、霍香薊葉脈黃化病毒 (Ageratum yellow vein virus) (Tan *et al.*, 1995; Harrison and Robinson, 1999) 只有單一基因體(缺少DNA B), 其DNA大小約2800核苷酸; 雙基因體的豆類金黃嵌紋病毒, 如East African cassava mosaic virus (EACMV)、CLCuV, 其DNA A和DNA B大小幾乎相等, 約2600-2800核苷酸, 二者核苷酸的序列不同, 但是同一病毒之基因區中約200核苷酸稱為intergenic region或common region部分, 卻是極為相似。目前所有已知的雙生病毒, 其common region的核苷酸的序列雖不盡相同, 但都包含了一個高度保留 (highly conserved) 區, 此區域的核苷酸序列可形成一個 stem-loop 結構 (詳述如後) (Lazarowitz, 1987; Matthews, 1991; Harrison and Robinson, 1999)。就其功能而言, DNA A決定病毒的複製和包被, DNA B 決定病毒的系統性轉移和病徵表現 (Brough *et al.*, 1988; Jeffrey *et al.*, 1996; Pascal, 1992)。

豆類金黃嵌紋病毒之基因體為 Ambisense, 意即其病毒股 (virion strand) 和互補股 (complementary strand), 在 DNA 上皆有蛋白質編碼的序列 (protein-coding sequence)。所有已知的雙生病毒都有 TAATATTAC 序列, 而其核苷酸序列之排序即以此 A 為第一個核苷酸 (Davies *et al.*, 1987)。本屬病毒有六個 open reading frames (ORF), 而在 common region 中有數個調節因子, 包括兩個 TATA motifs, 一個靠近 3'端, 一個位於 5'端, 功能可能分別涉及 AV1/AV2、AC1/AC4 轉錄的起始。在 common region 中也包含了一個高度保留區域, 具反向重複序列 (inverted repeat sequences), 可形成髮夾型 (hairpin-loop) 結構, 為 Rep 蛋白所辨識的地方, 也是病毒複製時所需要之序列 (Revington *et al.*, 1989; Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1998)。而在雙生病毒的診斷上最常用到的基因為外鞘蛋白基因 (coat protein gene, CP)。

CP 基因在豆類金黃嵌紋病毒基因體中, 是屬於較高度保留的區域, 同一地理區的病毒其外鞘蛋白胺基酸序列具高相似性。外鞘蛋白 (coat protein; CP) 的分子量約 28-33 KDa, 主要與病毒顆粒的包被 (encapsidation) 和寄主專一性及昆蟲傳播有相關 (Townsend *et al.*, 1985; Kallender *et al.*, 1988; Briddon *et al.*, 1990; Harrison and Robinson, 1999)。如 1990 年 Briddon 等人將由浮塵子傳播的雙生病毒的外鞘蛋白基因 BCTV 置換入由粉蝨傳播的雙生病毒內 ACMV (African cassava mosaic virus), 結果 ACMV 變成可經由浮塵子傳播 (Briddon *et al.*, 1990)。

在一些單基因體的豆類金黃嵌紋病毒中, 如番茄黃化捲葉病毒, 雖然缺乏 DNA B 之細胞核導引功能, 仍可進入植物細胞核中, 經實驗發現, 單基因體的豆類金黃嵌紋病毒之 CP 上有 nuclear localization signal (NLS) 序列可幫助將病毒外鞘蛋白送入植物或昆蟲的細胞核中 (Gafni *et al.*, 1997; Kunik *et al.*, 1998)。故外鞘蛋白可能也涉及了某些病毒移動的功能, 幫助病毒基因體運輸穿過細胞核膜 (Palanichelvam *et al.*, 1998)。若是刪除

或破壞 ORF 上 AV1 和 AV2 的序列會使得病毒 DNA 在植物體內的累積減少，同時也減少了系統性的感染(Kheyr-Pour *et al.*, 1991; Navot *et al.*, 1991; De Kouchkovsky *et al.*, 1993; Ridgen *et al.*, 1993)

而在病害診斷方面，雙生病毒病害診斷上常用的方法包括：電子顯微鏡法、光學顯微鏡法、酵素連結免疫吸附法(ELISA)、西方墨點法(Western Blot)、南方墨點法(Southern Blot)、以及聚合酵素鏈反應(PCR)等方法。各種方法在反應時間、靈敏度、價格與操作簡便性等方面各有利弊(於各論中介紹)，操作人員可依據實驗室中的所具備的儀器設備與可用預算經費選擇適用的方法。此外，最近由防檢局企劃組之經費支持進行的產學合作計劃所研發的“植物重要病毒快速診斷試劑套組”，也提供另一種快速簡便的雙生病毒診斷方法。該試劑套組具有下列優點：

- 1.可於常溫下運送及使用，無須低溫冷藏；
- 2.操作簡便，無需相關輔助儀器與藥劑或特殊訓練，可以肉眼進行判讀；
- 3.可於田間現場操作，反應時間短，可於一小時內獲知檢測結果；
- 4.一次可同時檢驗十組樣本，價格大眾化；
- 5.診斷靈敏準確度與常用之血清檢測法(ELISA、Western Blot)相當。

茲藉由此研討會向各位介紹此病毒診斷試劑套組之操作與應用。此套組將可作為未來抗病育種或種苗檢疫的基本工具。

各論：(請參閱所附 PowerPoint 檔案)

(一)、 Begomovirus 屬雙生病毒病害

由於全球交通運輸網路的便利，提供了雙生病毒及菸草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) 與受感染植物的傳播管道，病害的發生已逐漸由熱帶地區擴展至亞熱帶地區和溫帶地區，成為全球極具經濟重要性的植物病毒。由於雙生病毒的分子變異性大，據估計至少已產生 66 種以上不同的種 (species)，且已在 39 個國家造成嚴重的植物病害，而導致重大的經濟損失 (Moffat, 2000)。在台灣地區已於番茄、霍香薊、菸草、番茄、甘藷、聖誕紅等植物上發現豆類金黃嵌紋病毒屬之雙生病毒存在 (梁耀光等人, 1990; Tsai *et al.*, 1997)，造成葉片黃化及捲曲等病徵。近期中、南部亦發生番茄捲葉病之肆虐，使番茄幾無收成，顯見此病毒於台灣之經濟重要性。又其媒介昆蟲粉蝨類逐漸適應本地氣候環境及外國植物材料輸入之增加，可預見豆類金黃嵌紋病毒將成為台灣中、南部地區作物之主要病原之一。茲將數種較為常見的雙生病毒病害簡介於後：

1. 番茄捲葉病

此病害由 Tomato leaf curl virus (TLCV)、Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) 所引起 (Czosnek *et al.*, 1988)，是番茄作物主要的病害之一，最早在印度的番茄作物上發

現 (Vasudeva and Sam Raj, 1948; Makkout and Laterrot, 1983; B. Picó *et al.*, 1996)。所造成番茄作物的經濟損失可高達百分之百 (Makkout *et al.*, 1979; Ioannou, 1985; Moustafa and Nakhla, 1990; Polston *et al.*, 1994)，影響的範圍包括中東、北非和中非、東南亞、南歐，美洲等地 (Czosnek *et al.*, 1990; Moriones *et al.*, 1993; Nakhla *et al.*, 1994)。在感染豆類金黃嵌紋病毒後所產生的病徵，通常皆會有典型黃化(金黃色)、嵌紋、捲葉和矮化及皺縮的情況出現 (Bock, 1982; Goodman, 1981)。

2. 棉花的雙生病毒病害

由 Cotton leaf curl virus (CLCuV) 所引起的玉米和棉花病害，自 1930 年代即被發現，但是一直未受到科學家們的重視，直到在非洲、印度、巴基斯坦、南歐、南美洲、中美洲和其他地方造成重大損失後，才驚覺事態之嚴重 (Moffat, 2000)，進而開始進行研究。在棉花上則為典型的捲葉，葉緣下捲，葉片皺縮變形而形成葉表許多隆起，並造成簇生現象，產量大幅萎縮。

3. 樹薯嵌紋病

非洲人民主要的經濟作物樹薯，也有樹薯嵌紋病害，在 1988 年時曾於非洲、印度、斯里蘭卡造成十億英鎊的產量損失 (Fargette *et al.*, 1988)。各地不同種之間之樹薯嵌紋病害，因為基因間的重組、交換而產生的變異種，所造成的樹薯病害大流行，危害尤甚。估計每年在非洲地區造成的產量損失超過 20 億美元，使得原本就已貧窮地區之人民生活更加困苦 (Harrison and Robinson, 1999; Fondong *et al.*, 2000)。其病徵為葉片捲曲變形，葉面皺縮並顯現金黃色嵌紋，植株頂部萎縮變形，矮化。

4. 其他經濟作物

雙生病毒感染的寄主範圍十分廣泛，受影響的經濟作物尚有豆類、瓜類、胡椒、菸草等，不僅造成植物產量的損失還有品質的減低，估計每年可造成全世界有數百億美元以上的損失 (Moriones *et al.*, 1993; Czosnek and Laterrot, 1993; Green and Kalloo, 1994; Thresh *et al.* 1994; Ali *et al.*, 1995; Czosnek *et al.*, 1997)。雙生病毒在這些植物上所造成的病徵也類似其他的雙子葉植物，常見為葉片捲曲變形，葉面皺縮並顯現金黃色嵌紋，植株頂部萎縮變形，矮化。

5. 台灣地區雙生病毒病害

在台灣地區，1946 年時就有菸草黃化捲葉病的報告出現 (Matsumoto, 1946)。1988 年時曾於聖誕紅上發現類似雙生病毒感染的病徵 (Su and Tsai, 1988)。隨後亦於番茄、菸草、

甘藷、大青、石薯及藿香薊上也發現雙生病毒感染後所產生的內含體 (inclusion body) (梁 *et al.*, 1990)。近幾年來又陸續發現有作物及雜草發生類似雙生病毒感染造成金黃色嵌紋、莖頂黃化及葉片捲曲變形、皺縮等病徵，但是這些病害都要再進一步確定其病原。近期台灣中、南部地區，有些地區受到番茄捲葉病的肆虐，使得番茄幾乎失去收成，可以顯見此病毒對於台灣經濟的重要性。以下附圖分別顯示雙生病毒在番茄、豇豆、萵菜、莧菜、芥藍等農作物上，以及石薯、藿香薊、野牽牛等田間常見雜草上所造成的病徵。



***Lycopersicon esculentum*(番茄)**



***Phaseolus vulgaris*(豇豆)**



Beta vulgaris(莧菜)



Amaranthus mangostanus(莧菜)



Brassica nigra(芥藍)



Gonostegia pentandra(石薯)



Ageratum houstonianum(紫花霍香薷)



Ipomea obscura(野牽牛)

(二)、Begomovirus 屬雙生病毒診斷方法

1. 顯微鏡診斷法

本屬病毒的偵測最早是以病徵為診斷依據，輔以寄主範圍及昆蟲傳播。或是以較簡便的方法諸如光學顯微鏡簡易診斷法來發現病毒所造成的細胞核內含體，利用本屬病毒內含體的染色特性與存在位置與其他群病毒不同來區分，為一簡易的診斷方法(Christie *et al.*, 1986; Rushing *et al.*, 1987; Liang *et al.*, 1990)。也可利用電子顯微鏡掃描，觀察病毒顆粒的型態和細胞學的變化，但是由於雙生病毒在植物體內濃度低且不穩定，又常侷限於植物的韌皮部組織篩管細胞內，所以，利用顯微鏡診斷法會有所限制存在。

2. 血清診斷法

利用血清診斷是病毒鑑定上常用的方法，製作單株抗體和多株抗體來作為偵測工具，可應用的方法諸如免疫擴散法(immunodiffusion)、酵素結合免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、免疫吸附電子顯微鏡(immunosorbent electron microscopy)等(Sequeira and Harrison, 1982; Cohen *et al.*, 1983; Stein *et al.*, 1983; Al-Bitar and Luisoni, 1995)。利用血清來偵測不同種之間的豆類金黃嵌紋病毒，會因為寄主植物與其它病毒複合感染不易分離，或是病毒穩定性不高、濃度過低不易純化，使得抗血清的製作不易而受限。由文獻上幾個有限的血清偵測例子發現，對於不同豆類金黃嵌紋病毒均顯示很強之交互反應，無法區別相近或相遠的病毒(Cohen *et al.*, 1983; Sequeira and Harrison, 1982; Stein *et al.*, 1983)。而台灣至目前為止並無偵測豆類金黃嵌紋病毒血清之文獻報告。

3. 聚合酵素鏈反應

聚合酵素鏈反應，可以說是目前應用廣泛且靈敏的一項技術，利用設計一對高度保留的引子對，就可以很快的增幅出所要 DNA 的片段(Patel *et al.*, 1993; Atzmon *et al.*, 1994; Antoniwi, 1995; Wyatt and Brown, 1996)。但是，因為必須先從植物中萃取核苷酸再純化以得到病毒之 DNA，此項工作耗費的時間較久，所以亦出現很多改良的方法，例如直接從植物組織(Wyatt and Brown, 1996)或是將植物汁液點在硝化纖維膜上(Lin *et al.*, 1990; Navas-Castillo, 1998)，直接作聚合酵素鏈反應，如此可節省下不少的時間，但是因本屬病毒之間，高度保留的區域並不多，且變異性很大，所以偵測時必須設計很多的引子對，這是較為不便之處。且純化核酸時採樣的植物樣本必須含有相當量的病毒存在，否則在聚合酵素鏈反應時並無法增幅出所要 DNA 片段，這對實驗上也是一個很大的阻礙。茲以目前較為方便的方法簡介如下：

簡易 DNA 抽取 (Wyatt and Brown, 1996) :

取植物葉片 0.2 克，加入 2 ml TE 緩衝溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0)，磨碎後離心 14000g、30 分鐘，吸取 50 μ l 上清液於 PCR 管子中，置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30 分鐘後，去除上清液，再用 200 μ l TE 緩衝溶液清洗 PCR 管子三次，之後此 PCR 管子上因會吸附植物 DNA，可直接作聚合酵素鏈反應。或是將置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30 分鐘後的上清液十倍稀釋於 TE 緩衝溶液中，此萃取液中因含植物的 DNA，可直接用來作聚合酵素鏈反應。

而聚合酵素鏈反應可以修改自 Rojas 等人 (1993) 的方法進行：

在反應溶液 (20 μ l) 中，包含前面所述雙股 DNA 1 μ l，1 μ l 引子 (+)、引子 (-) 0.1 μ g/ μ l，0.5 mM dNTPs，2.5 mM MgCl₂，及 0.5 μ l Tag DNA 聚合酵素 (PROTECH) 1 U/ μ l，。反應所使用的機型為 Gene Amp[®] PCR System 2400 (PerKin Elmer; PE)。反應進行的條件為，94 $^{\circ}$ C, 3 分鐘、52 $^{\circ}$ C, 5 分鐘、72 $^{\circ}$ C, 5 分鐘，一個循環後; 94 $^{\circ}$ C, 1 分鐘、65 $^{\circ}$ C, 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C, 2 分鐘，35 個循環; 最後以 72 $^{\circ}$ C, 5 分鐘進行一個循環。反應完成後取 1 μ l 的反應物進行 1% 洋菜膠體電泳分析，並用 ethidium bromide (EtBr) 染色，檢測是否為所要的片段。

4. 其他改良診測法

除上述之方法外，尚可利用組織點漬法 (tissue printing) (Lin *et al.*, 1990)，直接將植物切面的汁液印於硝化纖維膜上，不但可偵測到組織中是否存在有病毒，也可以用來了解病毒在植物體內分布的位置，為有效的檢驗工具。不過，由於植物本身因為含葉綠素或其他有色物質，會在硝化纖維膜上留下顏色，因而干擾免疫血清偵測後的呈色反應結果，且在病毒量低時也容易造成誤判，所以將組織點漬法配合核酸雜合反應 (nucleic acid hybridization) 的組織轉印雜合 (tissue print hybridization)，也可有效且直接的對感病的葉片進行偵測 (Lin *et al.*, 1990; 王惠亮 *et al.*, 2000)。

5. 植物病毒快速診斷試劑套組：

防檢局於 91 年度起以經費支持，進行植物病毒快速診斷試劑套組之研發，並與高容生物科技股份有限公司進行產學合作，完成套組的商品化。

此病毒診斷試劑套組之作用原理近似於血清學診測法中的墨點法 (dot-blot analysis)，將受檢樣本點放於測試條上後，經由數種試劑與血清套組進行反應，在約半小時後即可由肉眼判讀是否感染病毒。帶毒受檢樣本將呈現紫色，而健康樣本則為無色。

此套組可於常溫下保存，操作簡便，無須使用實驗室中的儀器設備，可直接攜帶至田間進行檢測並可迅速現場獲得診斷結果，極為適合第一線工作人員使用。目前對於雙生病毒已針對危害最嚴重的番茄捲葉病開發番茄捲葉病毒之快速診斷試劑套組，其詳細操作步驟如下所述：

(本套組內已提供操作所需之所有必須工具與試劑藥品，不需再準備其他材料或設備，但如具有下列選配工具(optional)，則可使檢測工作更為簡便： 樣品研磨器或鐵鎚、電子秤、剪刀、計時器、塑膠手套與刀片)

步驟與方法：

- i. 切取番茄葉片 0.1 克，放入研磨塑膠袋中，再以針筒吸取稀釋液 1ml 後加入袋中。
以鐵鎚隔著塑膠袋將葉片打平後，再使用研磨器隔袋研磨。
- ii. 打開膠囊，將藥粉倒入 A 管中搖勻。並將測試條依長短大小，放置在測試條對應記錄紙上，並請填寫測試樣品名稱，以利測試結束後結果之比對。
- iii. 以藍色塑膠管尖沾取其汁液後，輕輕地點印在測試條的白色膜片的圓圈內。點印後的測試條，可先浸泡在 A 瓶中。等另一支測試條在點完檢體後，將兩支測試條以背對背的方式（白色膜片朝外）一起泡入 A 瓶中。並上下抽動 10 下後靜置。
- vi. 打開反應槽瓶，將其中的 B、C 反應槽插入紙盒的對應位置。並以剪刀剪開 B 液滴管封口，將藥劑滴入 B 槽中。C 液加入 C 槽中備用。將測試條自 A 瓶中取出，泡在 B 反應槽中，並上下抽動 10 秒後，浸泡 30 分鐘。
- v. 再將測試條泡在清洗液中上下抽動 10 秒。再泡回 A 瓶中，上下抽動 10 下
- vi. 測試條泡在 C 反應槽中，並上下抽動 10 秒後，浸泡 20 分鐘。並同前所述清洗後測試條靜置於清洗液中。將 D 溶液的滴管，以剪刀剪斷前端封口，注入 D 反應槽中。
- vii. 再將測試條泡入 D 反應槽中，並上下抽動 10 下後，浸泡 2 分鐘整（請確實遵守時間限制，避免偽信號出現）。反應進行時，請先將 E 瓶螺旋蓋打開。反應後，立即將測試條直接泡入 E 管中上下抽動 10 下後，靜置 1 分鐘。

- viii. 反應後，將測試條在 F 管中上下抽動 10 下後取出，讓測試條在清洗液中上下清洗 10 下。
- ix. 取出後，去除多餘液體，避光陰乾，再讀取信號。
- x. 判讀時，如測試條上白色膜圓圈內出現紫色點狀信號，表示檢測對象已經感染番茄捲葉雙生病毒(TLCV)。

結論：

雙生病毒於植物體內含量極低，且分布並不均勻，常成為病毒檢測工作上的障礙，故建議在診斷上，不可依賴單一次、單一方法的檢測結果。而這套由防檢局經費支持所進行商品化研發的植物病毒快速診斷試劑套組操作簡便，無須儀器設備，可直接攜帶於田間現場進行檢測並可於約一小時中獲得診斷結果，極為適合海關、改良場、育種單位等機構的第一線工作人員使用、未來可作為種苗防疫檢疫或抗病育種等工作的初步快速病毒篩檢工具。發現可疑植株後，可再進一部配合實驗室中的 PCR 等高靈敏度方法進行確認。

參考文獻：

- 梁耀光、楊佐琦、柯南靖。(1990)。台灣 geminiviruses 之發生及診斷。植保會刊 **32**, 136-144.
- 陳信宏。(1996)。銀葉粉蝨傳播番茄捲葉病毒之研究。國立中興大學昆蟲研究所碩士論文。
- 楊素華。(2000)。台灣中南部地區豆類金黃嵌紋病毒屬雙生病毒之診測及分子變異性分析。國立中興大學農業生物科技學研究所碩士論文。
- Al-Musa, A. (1982). Incidence, economic importance, and control of tomato yellow leaf in Jordan. *Plant Disease* **66**, 561-563.
- Atzmon, G., Oss, H. v. & Czosnek, H. (1998). PCR-amplification of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA from squashes of plants and whitefly vectors: application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 189-194.
- Bock, K. R. (1982). Geminivirus disease in tropical crops. *Plant Disease* **66**, 266-270.
- Bock, K. R. (1982). Geminivirus disease in tropical crops. *Plant Disease* **66**, 266-270.
- Brown, J. K. & Nelson, M. R. (1984a). Two whitefly-transmitted viruses of melons in the Southwest. *Phytopathology* **74**, 1136.
- Brown, J. K. & Nelson, M. R. (1989). Characterisation of watermelon curly mottle virus, a geminivirus distinct from squash leaf curl virus. *Annals of Applied Biology* **115**, 243-252.
- Caciagli, P., and Bosco, D. 1997. Quantitation over time of tomato yellow leaf curl geminivirus DNA in its whitefly vector. *Phytopathology* **87**:610-613.

- Cepto, K., Burick, P & Dawson, W. O. (1990). Time course of TMV 30K protein accumulation in intact leaves. *Virology* **174**, 290-293.
- Cohen, S., Duffus, J. E., Larsen, R. C., Liu, H. Y. & Flock, R. A. (1983). Purification, serology, and vector relationships of squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* **73**, 1669-1673.
- Cohen, A. C., R. T. Staten., and T. J. Henneberry. 1993. Evaluations of predators of sweetpotato whiteflies: laboratory and field cage studies. Proc. Beltwide. Cotton. Conf. 2: 710-713.
- Goodman, R. M. (1981). Geminiviruses. In *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis* 883-910.
- Hallan, V., Saxena, S. & Singh, B. P. (1998). Ageratum, Croton and Malvastrum harbour geminiviruses: evidence through PCR amplification. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **14**, 931-932.
- Harrison, B. D. and D. J. Robinson (1999). "Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses)." *Annual Review of Phytopathology* **37**: 369-398.
- Lin, N. S., Hsu, Y. H., and Hsu, H. T. 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* **80**:824-828.
- Luisoni, E., Milne, R. G. & Vecchiati, M. (1992). Purification and serology of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Recent advances in vegetable virus research. 7th Conference ISHS Vegetable Virus Working Group, Athens, Greece, July.*
- Mathews, R. E. F. 1979. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* **12**:129-296.
- Matsumoto, T. (1946). Tobacco disease in Formosa. *Mem Fac. Agric. Taiwan Univ.* **1**, 1-26.
- Mehta, P., Wyman, J. A., Nakhla, M. K. & Maxwell, D. P. (1994). Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by Bemisia tabaci. *Journal of Economic Entomology* **87**, 1291-1297.
- Moffat, A. S. (2000). Geminivirus emerge as serious crop threat. *Science* **286**, 1835-1837.
- Morales, F., Niessen, A., Ramirez, B., & Castano, M. (1990). Isolation and partial characterization of a geminivirus causing bean dwarf mosaic. *Phytopathology* **80**, 96-101.
- Paplomatas, E. J., Patel, V. P., Hou, Y. M., Noueiry, A. O., and Gilbertson, R. L. 1994. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology* **84**:1215-1224.
- Rataul, H. S. & Brar, J. S. (1989). Status of tomato leaf curl virus research in India. *Tropical Science* **29**, 111-118.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., and Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. *Plant Dis.* **77**:340-347.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Stein, V. E., Coutts, R. H. A. & Buck, K. W. (1983). Serological studies on tomato golden mosaic virus, a geminivirus. *Journal of General Virology* **64**, 2493-2498.
- Thresh, J. M., Fargette, D. & Otim-Nape, G. W. (1994). Effects of African cassava mosaic geminivirus on the yield of cassava. *Tropical Science* **34**, 26-42.
- Thottappilly, G. & Rossel, H. W. (1980). ELISA technique for detection of viruses of

- economically important food crops in the humid tropics of West Africa. *IITA Research Briefs* **1**, 1-2.
- Thouvenel, J. C., Fargette, D., Fauquet, C. & Monsarrat, A. (1984). Serological diagnosis of African cassava mosaic by immuno-enzymatic method. *Proceedings of the Sixth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. International Potato Centre, Lima, Peru.*
- Tsai, M. C., Liu, C. S. & Su, H. J. (1997). Poinsettia leaf curl, a new disease caused by a geminivirus. *J. Phytopathology* **145**, 347-350.
- Wyatt, S. D., and Brown, J. K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* **86**:1288-1293.
- Vasudeva, R. S., & Sam Raj, J. (1948). A leaf-curl disease of tomato. *Phytopathology* **38**, 364-369.
- Zhou, X. P., Liu, Y., Robinson, D. J. & Harrison, B. D. (1998). Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology* **79**, 915-923.

蘭花病毒診測試劑套組實務操作說明

本套組僅用以偵測蘭花所感染的蕙蘭嵌紋病毒 (CyMV) 與齒舌蘭輪斑病毒 (ORSV) 兩種病毒。

操作前，操作者自己所須準備的工具具有：

品名	說明
手套	只可使用一次，不能重複使用
刀片	用以切取蘭花葉片，不可重複使用
電子秤	精度在小數點以下兩位，用以秤量蘭花葉片重量
奇異筆	記錄測試樣品的編號或名稱
計時器或具有倒數計時的電子錶	計時用
剪刀	剪開藥劑滴管封口，勿使用曾經剪過蘭花植株的剪刀
衛生紙或面紙	用以吸取測試條上多餘的藥劑
組織研磨器 (推薦使用)	可節省蘭花葉片研磨時間，並利於葉片中汁液之釋放
微量液體分注器 (推薦使用)	精確吸取研磨液，可提高本試劑套組靈敏度

本試劑套組內含：

品名	說明	數量
說明書		1 份
測試條對應記錄表	用以標示測試樣品名稱，以利測試結束後結果之比對	1 張
研磨塑膠袋	以透明夾鏈袋裝起，可用於研磨蘭花葉片	9 個
D 液滴管黑色夾鍊袋	內裝 D 液滴管	1 個
1 ml 針筒	用以吸取稀釋液	1 支
測試條	裝在透明塑膠試管中	2 支
藍色管尖	用以沾取研磨後的汁液	9 支
稀釋液		1 瓶
B 液滴管	裝有加入 B 反應槽的藥劑	1 支
C 液滴管	裝有加入 C 反應槽的藥劑	1 支
反應槽瓶	以鋁蓋封口的玻璃瓶，內裝有 B 反應槽與 C 反應槽	1 瓶
清洗液	清洗測試條之藥劑	1 瓶
膠囊	內裝有粉末，須與 A 液瓶中的藥劑混合	1 個
A 液瓶		1 支
D 反應槽		1 支
E 液瓶		1 瓶
F 液瓶		1 瓶

注意事項

1. 為避免無意間傳播蘭花病毒，使用本試劑套組的過程中，請全程戴上手套操作。
2. 請避免手、眼直接接觸或誤食試劑內藥劑！操作結束後，請立即洗手後再取食食物或飲水。
3. 為避免縮短本測試套組的有效保存期限，敬請將本試劑套組存放在陰涼乾燥的位置。避免陽光、高溫與高濕對於藥劑的破壞，以有效地保持其功能性。

4. 本檢測試劑套組僅用於體外測試。

試劑套組操作步驟

1. 切取蘭花葉片 0.1 克，放入研磨塑膠袋，加入稀釋液後隔袋研磨

切取新鮮蘭花葉片 0.1 克（如圖 1），放入研磨塑膠袋中。以針筒吸取稀釋液 1ml 後加入袋中（如圖 2）。以塑膠管隔著塑膠袋將葉片擱平後，再使用硬物或研磨器隔袋研磨。

- 注意：
- a. 請切取老葉靠近尖端的部分，但請勿切取葉尖或乾枯的部位。（如圖 1）
 - b. 切取蘭花葉片所使用的刀片與手套，不可重複使用，以避免病毒交互感染。
 - c. 研磨葉片請勿刮破塑膠袋，並將開口端向上折起後研磨，避免病毒污染（如圖 3）。



圖 1



圖 2



圖 3

2. 打開膠囊，將藥粉倒入 A 管中搖勻

將膠囊取出，紫色端朝上，藍色端在硬物上輕敲數下，再逆時針旋開紫色端（如圖 4），把藥粉倒入 A 管中（如圖 5）。並鎖上螺旋蓋。上下搖勻，讓其中的藥劑充分溶解後備用。

注意：或將膠囊內的藥劑倒在秤藥紙上，以利倒入 A 瓶中（如圖 6）。



圖 4



圖 5



圖 6

3. 將測試條依長短大小，放置在測試條對應記錄紙上

並請填寫測試樣品名稱，以利測試結束後結果之比對（如圖 7）。

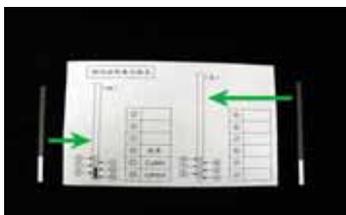


圖 7

4. 以藍色管尖沾取汁液，輕輕地點印在測試條的白色膜片上

以藍色塑膠管尖沾取其汁液後（如圖 8），輕輕地點印在測試條的白色膜片的圓圈內（如圖 9）。只需輕輕地點印一次，以避免戳破膜片，影響反應。

- 注意：
- a. 藍色塑膠管尖外面如果沾有多餘的汁液吸附在管壁外，請以研磨塑膠袋的邊緣刮除後，再點在白色膜片上（如圖 10）。
 - b. 含植物汁液之藍色塑膠管請與白色膜片垂直，以利汁液之釋放。

- c. 除藍色塑膠管尖點印白色膜片外，膜片不可接觸任何物品。
- d. 請將汁液點印在測試條白色膜片的圓圈內。如點印在其他位置，反應後將會形成偽信號，而導致誤判。
- e. 請將汁液依序點上，每組套組可以檢測九個樣品。O, C, H 三點請勿點印汁液。

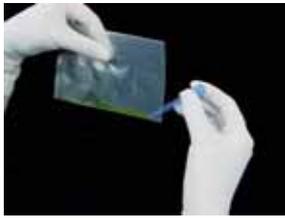


圖 8



圖 9

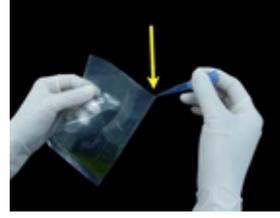


圖 10

5. 點印後的測試條，浸泡在 A 瓶中

先點完的測試條可先泡入 A 瓶中。另一支測試條在點完檢體後，將兩支測試條以背對背的方式（白色膜片朝外）一起泡入 A 瓶中。並上下抽動 10 下後靜置（如圖 11）。

注意：測試條點印完成後，其白色膜片不可相互接觸，以避免信號干擾。

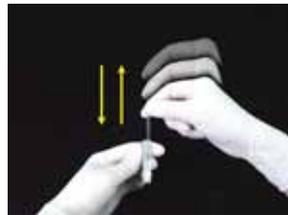


圖 11

6. 取出反應槽，將滴管中的藥劑加入槽中

取出反應槽瓶，順著箭頭的方向打開鋁蓋（如圖 12），並取下橡膠蓋。將其中的 B、C 反應槽取出（如圖 13），插入紙盒的對應位置（如圖 14）。



圖 12



圖 13

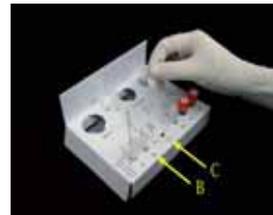


圖 14

並以剪刀剪開 B 液滴管封口（如圖 15），將藥劑滴入 B 槽中（如圖 16）。C 液加入 C 槽中備用。

注意：為讓藥劑順利到達槽底，請將反應槽開口朝上，向下輕甩，以避免氣泡影響反應。（如圖 17）



圖 15



圖 16



圖 17

7. 測試條泡入 B 反應槽中，反應 10 分鐘

將測試條取出，泡在 B 反應槽中，並上下抽動 10 秒後（如圖 18），浸泡 10 分鐘。
注意： a. 測試條上下抽動時，為避免槽內的氣泡影響反應，請將反應槽開口朝上，連同測試條及反應槽向下輕甩，讓藥劑順利到達槽底（如圖 19）。

b. 如欲提高病毒偵測靈敏度，每隔 5 分鐘上下抽動 10 秒後，重複反應槽開口朝上，連同測試條及反應槽向下輕甩，讓藥劑順利到達槽底的動作。



圖 18



圖 19

8. 測試條放入清洗液中清洗後，測試條再泡回到 A 瓶中

再將測試條泡在清洗液中上下抽動 10 秒（如圖 20），再泡回 A 瓶中，上下抽動 10 下後（如圖 21）。



圖 20

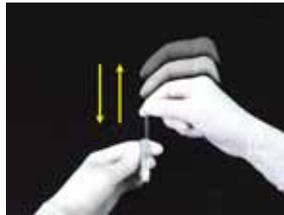


圖 21

9. 測試條泡入 C 反應槽中，反應 10 分鐘

測試條泡入 C 反應槽中，並上下抽動 10 下（如圖 22）後，浸泡 10 分鐘。

注意： a. 測試條上下抽動時，為避免槽內的氣泡影響反應，請將反應槽開口朝上，連同測試條及反應槽向下輕甩，讓藥劑順利到達槽底（如圖 23）。

b. 如欲提高病毒偵測靈敏度，每隔 5 分鐘上下抽動 10 秒後，重複反應槽開口朝上，連同測試條及反應槽向下輕甩，讓藥劑順利到達槽底的動作。



圖 22



圖 23

10. 測試條泡入清洗液中清洗後，暫置於清洗瓶中

再將測試條泡在清洗液中上下抽動 10 秒後（如圖 24），暫置於清洗瓶中。



圖 24

11. 測試條泡入 D 反應槽，反應 2 分鐘

打開裝有 D 溶液滴管的黑色拉鍊袋，將 D 溶液的滴管，以剪刀剪斷前端封口（如圖 25），注入 D 反應槽中（如圖 26）。並將反應槽向下輕甩，讓藥劑順利到達槽底（如圖 27）。



圖 25



圖 26



圖 27

再將測試條取出，以衛生紙去除多餘的液體後（如圖 28），泡入 D 反應槽中，並上下抽動 10 下（如圖 29）後，浸泡 **2 分鐘整**（請確實遵守時間限制，避免偽信號出現）。反應進行時，請先將 E 瓶螺旋蓋打開。

注意： a. 測試條上下抽動時，為避免槽內的氣泡影響反應，請將反應槽開口朝上，連同測試條及反應槽向下輕甩，讓藥劑順利到達槽底（如圖 30）。

b. 如欲測試的病毒具有接觸傳染性，請將測試條前端輕觸衛生紙，用以吸除多餘液體。但請勿直接接觸白色膜片，以免影響反應進行。



圖 28



圖 29



圖 30

12. 測試條泡入 E 管中，反應 1 分鐘

反應後，立即將測試條直接泡入 E 管中上下抽動 10 下後（如圖 31），靜置 1 分鐘。

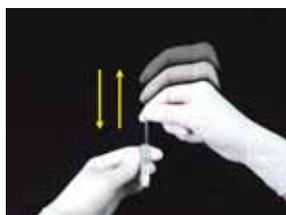


圖 31

13. 測試條泡入 F 管中清洗，再放入清洗液中清洗

反應後，將測試條在 F 管中上下抽動 10 下後取出（如圖 32），讓測試條在清洗液中上下清洗 10 下（如圖 33）。

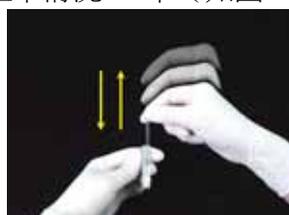


圖 32



圖 33

14. 取出後，去除多餘液體，避光陰乾，再讀取信號。

注意： a. 將測試條前端輕觸衛生紙，以去除多餘液體（如圖 34）。

b. 可將反應後的測試條，放在試劑套組盒中，蓋上蓋子，避光陰乾（如圖 35）。



圖 34



圖 35

測試結果判讀

測試條上白色膜圓圈內，如出現紫色點狀信號，表示檢測對象已經感染**蕙蘭嵌紋病毒 (CyMV)** 或**齒舌蘭輪斑病毒 (ORSV)**，或是**兩種病毒均有感染**。

