

台灣山葵上發生的山葵斑駁病毒之鑑定

鄧汀欽^{1,*} 蔡錦慧² 寧方俞³

摘要

鄧汀欽、蔡錦慧、寧方俞。2016。台灣山葵上發生的山葵斑駁病毒之鑑定。台灣農業研究 65(1):103–108。

2012年4月自嘉義縣阿里山鄉採集山葵植株，以葉片汁液進行接種試驗，在奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 葉片形成局部病斑，經單斑分離得病毒純系。經酶聯抗體免疫分析 (ELISA) 及西方轉漬反應 (Western blot)，這些分離株與番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*; ToMV) 抗體有交互反應 (cross reaction)。接種試驗結果顯示，其寄生範圍主要在十字花科植物，但不感染油菜及初秋甘藍。取其全量 RNA，以 *Tobamovirus* 廣效性引子對 TMVmpf 及 TMV3nr 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)，結果得到一個 688 bp 的片段。此片段為病毒的部分鞘蛋白 (CP) 及部分移動蛋白 (MP) 的基因，經解序後與 GenBank 中核苷酸序列比對，結果與山葵斑駁病毒栃木分離株 (*Wasabi mottle virus* Tochigi isolate, Acc. No. AB017504) 的對應片段，相同度達 99%。親緣分析結果，則顯示其 CP 基因的產物與 Acc No. BAA28951 (a wasabi strain of crucifer *Tobamovirus*) 的對應片段之相同度為 99.3%，但與 ToMV 昆士蘭分離株 (Acc No. NP_78449) 的相同度僅 49%，因此鑑定這些山葵分離株即是山葵斑駁病毒 (WMoV)。利用 ELISA 檢測阿里山區的山葵植株，共調查 187 個樣本，其中有 66 個呈陽性反應，進一步核酸分析鑑定亦皆為 WMoV。本報告雖是台灣 WMoV 的首發紀錄，但 WMoV 應早已存在於阿里山區。

關鍵詞：菸草嵌紋病毒屬、阿里山、番茄嵌紋病毒、十字花科。

前言

山葵 (wasabi) 的根、莖、葉都可以食用，是原產於日本的多年生草本植物，學名為 *Wasabia japonica* (Miq.) Matsumura，屬於十字花科 (Brassicaceae)。一般食用肥厚短縮的莖部，需種植 18–24 mo 才能收成。生長適溫約 13–8°C，夏季溫度不能過高，適合種植於谷地或流動水邊。台灣在 1914 年自日本引進種植於阿里山區，利用天然森林的林間，以旱地栽培方式種植。山葵的產值高，市場需求率也很高，1997 年台灣栽培面積曾達 600 ha。近年雖有實生苗或試管苗生產，但傳統栽種方式大多以莖節長出的分株芽 (offshoot) 行無性繁

殖。以往台灣無山葵病毒病的紀錄，業者也未注意種苗帶病毒的問題，近來田間疑似病毒感染現象已逐漸浮現且蔓延至各栽培區域，本報告進行台灣山葵病毒病調查與鑑定，提供作為防治之基礎。

病毒來源

病毒來源是在 2012 年 4 月從嘉義縣阿里山鄉採集的山葵植株，具明顯黃化嵌紋及皺葉之病徵 (圖 1A)，加入 10 倍 (W/V) 體積之 0.1 M 磷酸鈉緩衝液 (pH 7.4) 研磨葉片，以汁液磨擦接種於灑有 400 mesh 金鋼砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片。於接種後

投稿日期：2015 年 6 月 9 日。接受日期：2015 年 7 月 10 日。

* 通訊作者：tcde@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

³ 農委會茶業改良場茶作課助理研究員。台灣 桃園縣。

3–5 d 即出現局部病斑 (圖 1B)，經過 3 次挑單斑分離得到單斑純系病毒株，作為後續試驗之病毒接種源。

寄主範圍試驗

寄主範圍試驗的結果，顯示山葵病毒分離株接種十字花科 (Brassicaceae) 植物，可以感染青江菜及切葉小白菜 (*Brassica rapa* L. *chinensis*)、包心白菜 (*B. rapa* L. *pekinensis*)、包心芥菜 (*Brassica juncea* var. *foliosa* Bailey.)、芥菜心 (*Brassica juncea* var. *tsatsai* Mao)、結球甘藍 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)、乳酪花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*)、蘿蔔 (*Raphanus sativus* L.)、

胡椒草 (*Lepidium sativum* L.) 等，但不感染油菜 (*Brassica napus* L.) 及初秋甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. *Chu-chiu*)。接種茄科 (Solanaceae) 植物，可以系統性感染香瓜茄 (*Solanum muricatum* Ait.)、「嬌娘」茄 (*Solanum melongena* L. cv. *Charming*) 及圓葉菸 (*Nicotiana benthamiana* Domin) 與 *Nicotiana debneyii* Domin 兩種菸草，局部感染「昭君」茄 (*Solanum melongena* L. cv. *Fullness*) 及心葉菸 (*Nicotiana glutinosa* L.) (圖 1C)、白肋菸 (*Nicotiana tabacum* L. cv. *White Burley*)；不感染「萬國土」菸草、「喜綠」茄、4 種番椒 (*Capsicum* spp. L.) (朝天椒、咖啡椒、鬼椒、朱姬甜椒) 及 8 種番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) («鐵娘」、「新光」、「春光」、「美女」、「秀女」、

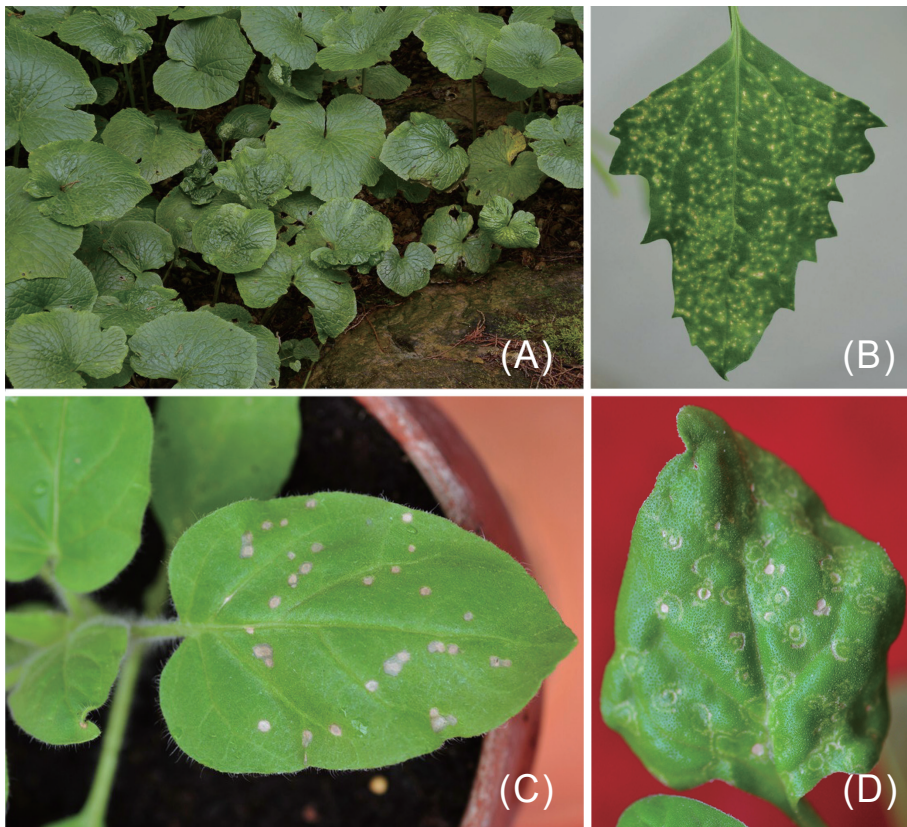


圖 1. 阿里山鄉山葵植株具明顯黃化嵌紋及皺葉之病徵 (A)；山葵病毒接種後出現典型局部病斑：奎藜 (*Chenopodium quinoa*) (B) *Nicotianaglutinosa* (C) 及番杏 (*Tetragonia tetragonioides*) (D)。

Fig. 1. Rugose and yellow mosaic symptoms of wasabi plants grown in Alishan area (A). Typical local lesions appeared on leaves after inoculation of wasabi virus isolate to plants of *Chenopodium quinoa* (B), *Nicotiana glutinosa* (C), and *Tetragonia tetragonioides* (D).

「金瑩」、「金玉」、「一點紅」)。此外，山葵病毒分離株對千日紅 (*Gomphrena globosa* L.) 及番杏 [*Tetragonia tetragonioides* (Pall.) O. Kuntze] (圖 1D) 都有 tobamovirus 典型的局部壞疽病斑，但如上所述，對茄科植物的致病性則明顯異於番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*; ToMV) (Deng *et al.* 2012)。以上所有寄主範圍試驗的病毒感染，都再經酶聯抗體免疫分析 (ELISA) (Clark & Adams 1977) 確認。

血清學反應

血清學反應的抗體引用先前報告的 ToMV 抗血清 (Deng *et al.* 2012)，純化其免疫球蛋白 (IgG) 進行酶聯抗體免疫分析 (ELISA) (Clark & Adams 1977) 及西方轉漬分析 (Western blot) (Towbin *et al.* 1979)。抗原則取接種保存於奎藜葉片之病毒株包括：ToMV 香瓜茄分離株 (ToMV-Pepino)、CY00343 番茄種傳分離株 (ToMV-Tomato seed trans.)、山葵-1 分離株、山葵-4 分離株、山葵-22 分離株及健康奎藜對照組，ELISA 反應值及西方轉漬結果如圖 2 所示，3 株山葵病毒分離株與 ToMV 抗體都有交互反應 (cross reaction)。

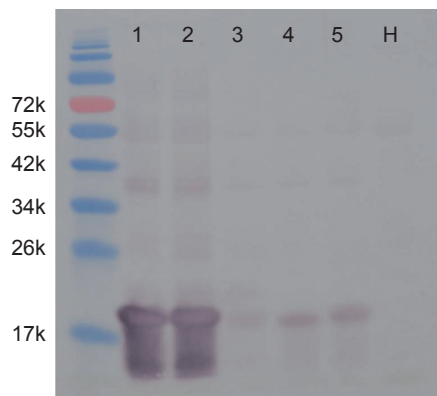


圖 2. 以 ToMV 抗體進行酶聯抗體免疫分析及西方轉漬分析之結果。行 1：香瓜茄分離株 (ELISA 反應值 1.478)；行 2：CY00343 番茄種傳分離株 (ELISA 反應值 2.027)；行 3：山葵-1 分離株 (ELISA 反應值 0.234)；行 4：山葵-4 分離株 (ELISA 反應值 0.417)；行 5：山葵-22 分離株 (ELISA 反應值 0.554)；行 H：健康對照組 (ELISA 反應值 0.085)。

Fig. 2. Results of serological reactions of ELISA and Western blot using antibody to ToMV. Lane 1: ToMV-Pepino (ELISA value 1.478); Lane 2: ToMV-Tomato seed trans (ELISA value 2.027); Lane 3: Wasabi-1 (ELISA value 0.234); Lane 4: Wasabi-4 (ELISA value 0.417); Lane 5: Wasabi-22 (ELISA value 0.554); and Lane H: Healthy CK (ELISA value 0.085).

核酸定序與親緣分析

取 100 mg 各病毒株的葉組織，以純化試劑組 (Plant Total RNA Extraction Miniprep System; Viogene, CA, US) 萃取病毒全量 RNA。應用 *Tobamovirus* 廣效性引子對 TMVmpf (5'-AGTTGTTGATGAGTTCATGGA-3')/TM-V3nr (5'-CAACCCCTTCGATTTAAGTGGA-3') (Huang *et al.* 2004)，及反轉錄-聚合酶連鎖反應試劑 (AccuPowerRT/PCR Premix; Bioneer, Daejeon, Korea) 進行反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)，於 MultiGene TC-9600 Thermo Cycler (Labnet, Edison, NJ, US) 中進行增幅反應，反應條件如下：先於 70°C 反應 5 min，10°C 反應 10 min，42°C 反應 60 min，94°C 反應 2 min，之後再進行 94°C 30 s，55 s，70°C 60 s，共 35 個循環，最後 1 個循環為 70°C 下聚合延伸 10 min。反應結果的 DNA 產物以電泳進行分析，ToMV 可增幅出 800 bp 之核酸片段，但所有山葵分離株都僅得到 1 個 688 bp 的片段 (圖 3)。由 3 個山葵分離株 RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段，以小量膠體 DNA 回收組 (Gel Advanced Extraction Miniprep System; Viogene, CA, US) 回收及純化，再以 yT&A

載體及 ECOS101 勝任細胞 (competent cell) (Yeastern Biotech, 台北) 進行選殖, 委由明欣生物科技公司 (台北) 進行核苷酸序列分析。

將山葵病毒分離株定序片段 (部分 CP 基因 + 部分 MP 基因) 的序列與 Genebank 上已登錄其他 *Tobamoviruses* 之對應基因核苷酸序列進行比對, 利用 ClustalX2 (<http://www.clustal.org/>) 進行 alignment, 結果顯示山葵分離株的基因對應片段與山葵斑駁病毒栃木分離株 (*Wasabi mottle virus* Tochigi isolate, Acc No. AB017504) (Shimamoto *et al.* 1998) 的相同度最高達 99%。再以 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (<http://www.megasoftware.net/>) 之 Neighborhood-joining 以 CP 基因的胺基酸產物作成親緣關係樹狀圖, 如圖 4 所示山葵分離株 4 (Alishan wasabi 120525-4) 與山葵分離株 1 (Alishan wasabi 1) 及山葵分離株 22 (Alishan wasabi120530-22) 比對, 相似度約 97–99%, 與 Acc No. BAA28951 (a wasabi strain of crucifer *Tobamovirus*) (Shimamoto *et al.* 1998) 的對應片段之相似度為 99.3%, 但與澳洲昆士蘭 ToMV 分離株 (Acc

No. NP_078449) 的相同度僅 49%。因此, 這些山葵病毒分離株均鑑定屬於山葵斑駁病毒 (*Wasabi mottle virus*; WMoV)。WMoV 的分類地位屬於 *Tobamovirus* 屬 *Virgaviridae* 科, 在 2005 年已經由 ICTV (8th Report) 正式核定。

病毒發生調查

病毒發生調查共採集阿里山區的山葵植株 187 個樣本, 利用 ELISA 檢測, 其中有 66 個樣本與 ToMV 抗體呈陽性反應, 進一步核酸分析鑑定亦皆為 WMoV。WMoV 雖如同 TMV 或 ToMV 可感染 *Nicotiana* 屬植物, 且對 *N. glutinosa*、千日紅及番杏都有 *Tobamovirus* 典型的局部壞疽病斑, 但對茄科植物的致病性明顯低於 ToMV, 尤其是對所有供試番茄品種都無致病力, 因此對茄科作物生產與採種作業的影響較小。WMoV 與 TMV 或 ToMV 有血清交互反應關係, 且判別寄主的反應類似, 因此在有核酸分析工具前, 日本 (Oshima *et al.* 1971; Oshima *et al.* 1974; Kashiwazaki *et al.* 1990; Takahashi & Shohara, 1990) 及韓國 (Kim & Lee 1999) 往年所報告的 TMV wasabi

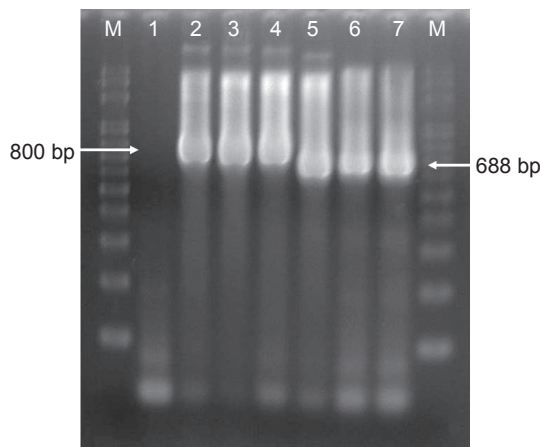


圖 3. 以引子對 TMVmpf 及 TMV3nr 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應之結果。行 1：健康對照組；行 2：ToMV 香瓜茄分離株；行 3：ToMV 草屯番茄分離株；行 4：ToMV 番茄種傳分離株；行 5：山葵-1 分離株；行 6：山葵-4 分離株；行 7：山葵-22 分離株；及行 M：分子量標誌。行 2–4 為 ToMV 分離株可增幅出約 800 bp 的 DNA 產物；行 5–7 為山葵病毒分離株都得到一個 688 bp 的片段。

Fig. 3. Results of RT-PCR using primers of TMVmpf/TMV3nr. Lane 1: Healthy CK; Lane 2: ToMV-pepino; Lane 3: ToMV-Tsautun tomato; Lane 4: ToMV-tomato seed trans; Lane 5: Wasabi-1; Lane 6: Wasabi-4; Lane 7: Wasabi-22; and Lane M: marker. Lanes 2–4 showed the 800 bp DNA fragments produced by ToMV isolates; and Lanes 5–7 showed the 688 bp DNA fragments produced by viruses of wasabi isolates.

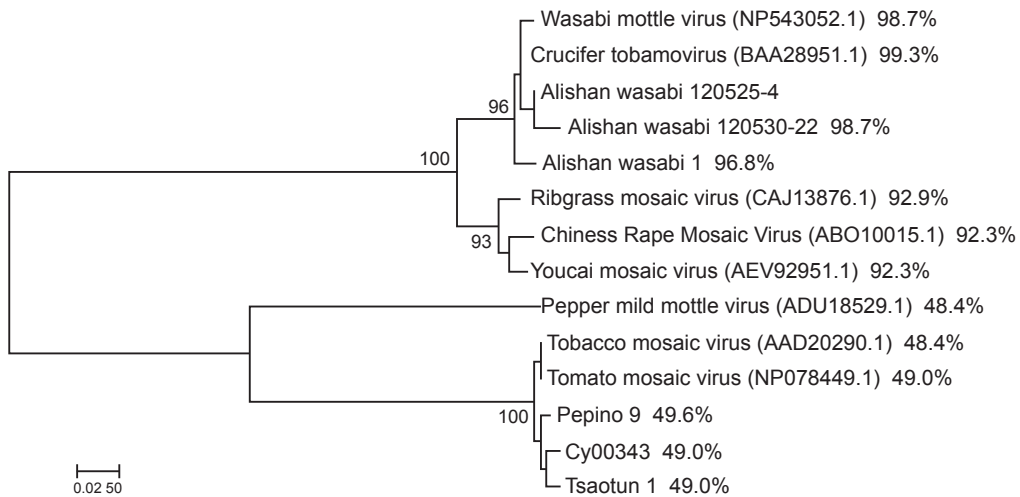


圖 4. 山葵斑駁病毒分離株鞘蛋白基因胺基酸產物以 MEGA4 進行親緣關係分析之樹狀圖。其中包含 Alishan 120525-4 (山葵-4 分離株)、Alishan wasabi 1 (山葵-1 分離株)、Alishan wasabi 120530-22 (山葵-22 分離株)、Pepino 9 (ToMV 香瓜茄分離株)、Cy00343 (ToMV 番茄種傳分離株) 及 Tsaotun (ToMV 草屯番茄分離株)。

Fig. 4. Phylogenetic dendrogram of coat protein gene of WMoV isolates (Alishan 120525-4, Alishan wasabi 1, and Alishan wasabi 120530-22) and ToMV isolates (Pepino 9, Cy00343, and Tsaotun). The tree was generated by neighborhood-joining method (MEGA4). The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1,000 replications. Bar = 0.025 changes per nucleotide.

strain 部分可能是 WMoV。WMoV 對十字花科植物有專一的病原性，但台灣過去未曾注意山葵的病毒問題，本報告是 WMoV 在台灣的首發紀錄，在公開發表前已以新鑑定的病害項目知會農委會動植物防疫檢疫局，但 WMoV 應在此之前已存在於阿里山區。

引用文獻

- 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.
- Deng, T. C., Y. T. Lin, C. H. Tsai, J. Y. Liao, Y. H. Cheng, Z. H. Lee, C. C. Shih, and Y. C. Chen. 2012. Identification and occurrence of a *Tomato mosaic virus* infecting pepino (*Solanum muricatum*) plants in Penghu, Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 54:47–64. (in Chinese with English abstract)
- Huang, J., C. Deng, Z. Fan, G. Tian, and H. Li. 2004. Isolation and identification of *Tobacco mosaic virus* infecting *Syringa oblata*. *Acta Phytopathol. Sin.* 34:215–220.
- Kashiwazaki, S., K. Shimazu, and T. Tsuchizaki. 1990. Serological properties of wasabi strain of tobacco mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 56:257–260.
- Kim, H. M. and K. J. Lee. 1999. Characteristics of tobacco mosaic virus isolated from wasabi (*Eutrema wasabi*) in Korea. *Plant Pathol. J.* 15:247–250.
- Oshima, N., Y. Ohashi, and M. Umekawa. 1971. Studies on some strains of tobacco mosaic virus pathogenic to Crucifer plants I. Physical and chemical studies. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 37:319–325.
- Oshima, N., Y. Ohashi, and M. Umekawa. 1974. Studies on some strains of tobacco mosaic virus pathogenic to Crucifer plants 2. Host range. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 40:243–251.
- Shimamoto, I., S. Sonoda, P. Vazquez, N. Minaka, and M. Nishiguchi. 1998. Nucleotide sequence analysis of the 3' terminal region of a wasabi strain of crucifer tobamo virus genomic RNA: Subgrouping of crucifer tobamo viruses. *Arch. Virol.* 143:1801–1813.
- Takahashi, Y. and K. Shohara. 1990. Practical detection of wasabi strain of tobacco mosaic virus by using cocktail monoclonal antibodies. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 56:621–627.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350–4354.

Identification of *Wasabi mottle virus* Infecting Wasabi in Taiwan

Ting-Chin Deng^{1,*}, Chin-Hui Tsai², and Fang-Yu Ning³

Abstract

Deng, T. C., C. H. Tsai, and F. Y. Ning. 2016. Identification of *Wasabi mottle virus* infecting wasabi in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 65(1):103–108.

Virus-liked wasabi plant samples were collected in Alishan Township, Chiayi in April 2012. By leaf sap inoculation, local lesions were developed on *Chenopodium quinoa*, from which pure virus isolates were obtained through single lesion isolation. The isolates were crossly reacted with antibody to *Tomato mosaic virus* (ToMV) when tested by enzyme-linked antibody immunoassay (ELISA) or Western blot. Results of inoculation tests showed that the host range was mainly limited in cruciferous plants, except for *Brassica napus* and *B. oleracea* L. var. *capitata* cv. Chu-chiu. Total viral RNA was purified and a pair of *Tobamovirus*-general primers (TMVmpf and TMV3nr) was applied to conduct reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and that resulted in producing a 688 bp DNA fragment. The nucleotide sequence of the fragment (part of the CP gene and part of MP gene) was determined. BLAST analysis of this fragment revealed the virus isolate shared the maximum nucleotide identities (99%) with *Wasabi mottle virus* Tochigi isolate (AB017504). Phylogenetic analysis also showed that the viral CP gene was 99.3% identical to a wasabi strain of crucifer *Tobamovirus* (Acc No. BAA28951), compared with 49% identities to an isolate of ToMV from Queensland, Australia (NP_078449). Therefore, the virus isolates were identified as a *Wasabi mottle virus* (WMoV). However, the virus was detected in 66 out of 187 wasabi plant samples collected in Alishan area and all of these positive samples were further identified as WMoV by nucleic acid analysis. This paper is the first report of WMoV occurred in Taiwan, but WMoV should have been existed in the Alishan area already.

Key words: *Tobamovirus*, Alishan, *Tomato mosaic virus*, Brassicaceae.

Received: June 9, 2015; Accepted: July 10, 2015.

* Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw

¹ Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Assistant Research Fellow, Departments of Tea Agronomy, Tea Research and Extension Station, Taoyuan, Taiwan, ROC.