

甜瓜黃斑病毒感染胡瓜在臺灣之首次記錄

趙佳鴻

臺中區農業改良場助理研究員

摘 要

2007 年田間病害調查於本場簡易網室內種植之胡瓜葉片上出現壞疽斑點、黃化、嵌紋，類似由植物病毒引起之病徵；而觀察此病徵發現普遍於新生葉片出現嵌紋病徵，隨病勢進展在較老葉片上出現黃化病斑，鄰近斑互相癒合成大型塊斑，黃化後期逐漸轉為壞疽，導致全葉壞疽。罹病組織經單斑分離及迴接健康胡瓜苗出現與田間發現之相同病徵，以機械接種方法將此病毒接種於臺灣常見之 8 個胡瓜栽培品種，在所有測試植株新葉上皆出現與田間相同之嵌紋病徵。以電子顯微鏡觀察罹病葉片粗汁液可見直徑 70-110 nm 之球形病毒顆粒且經酵素聯接免疫血清反應法分析、媒介昆蟲南黃薊馬(*Thrips palmi*)傳播試驗；再以 *Tospovirus* 屬 L 基因上高保留性區域序列設計之 2 組簡併性引子及以病毒核鞘基因序列設計專一性引子進行反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)進行偵測，綜合上述試驗結果顯示此病毒為 *Tospovirus* 屬之洋香瓜黃斑病毒(*Melon yellow spot virus*, MYSV)。利用反轉錄聚合酵素連鎖反應增幅此病毒鞘蛋白基因並定序，將所得之鞘蛋白基因序列與基因庫(Gene Bank)中已發表之 *Tospovirus* 屬各病毒鞘蛋白基因序列進行比對分析，經比對後與 MYSV 臺灣西瓜分離株及日本、泰國發現之 MYSV 瓜類分離株具 98-99% 之核酸序列相同度(nucleotide identity)。綜合以上試驗結果初步鑑定引起臺灣胡瓜壞疽斑點、黃化及嵌紋的病毒為 *Tospovirus* 屬之洋香瓜黃斑病毒，此外本研究亦為臺灣首次發現 MYSV 可感染胡瓜之報告。

中英文關鍵字：胡瓜 *Cucumber (Cucumis sativus L.)*, 甜瓜黃斑病毒
Melon yellow spot virus, 番茄斑萎病毒屬 *Tospovirus*。

前 言

甜瓜黃斑病毒 (*Melon yellow spot virus, MYSV*) 首次從日本靜岡甜瓜田內發現，後並確定為一個 *Tospovirus* 屬獨特的品系。後來，*MYSV* 可危害胡瓜的記錄在日本高知縣被發現。從那時起，*MYSV* 陸續被發現在泰國的甜瓜和黃瓜，以及日本的苦瓜造成嚴重的損害。在臺灣，可自然感染瓜類的病毒已經被報導，包括蚜蟲媒介或機械傳播的木瓜輪點病毒 (*Papaya ringspot virus, PRSV*)，矮南瓜黃化嵌紋病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV*)，胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus, CMV*)，西瓜嵌紋病毒-2 (*Watermelon mosaic virus-2, WMV-2*) 及甜瓜脈綠嵌紋病毒 (*Melon vein-banding mosaic virus, MVbMV*) (*MvbMV*)，種子或汁液機械傳播的胡瓜綠斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV*)，粉蝨傳播的菲律賓南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippine virus, SLCPhV*)，甜瓜捲葉病毒 (*MLCV*)，蓟馬傳播媒介的西瓜銀斑病毒 (*WSMoV*) 及甜瓜黃斑病毒 (*MYSV*)。

Tospovirus 屬為 *Bunyaviridae* 科中唯一可感染植物之一屬，其球型病毒顆粒直徑約為 80-110 nm，外覆含醣蛋白之脂質套膜 (envelop)，可經由蓟馬以永續性 (persistent) 的方式傳播，其寄主範圍廣泛且防治不易，為全球重要性之植物病毒。核鞘蛋白 (nucleocapsid protein, NP) 是 *Tospovirus* 屬病毒 (tospoviruses) 主要的結構性蛋白，為鑑定與診斷此類病毒之重要依據。根據核鞘蛋白之序列同源性與血清學關係，將現行 20 種正式和臨時 *tospovirus* 物種 (species) 分類為三大血清群及三個獨立的血清型 (serogroup)，以西瓜銀斑病毒 (*WSMoV*)，番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*) 和鳶尾花黃斑病毒

(Iris yellow spot virus, IYSV)作為類型的成員，同一血清群的病毒之核鞘蛋白互有血清反應，而獨立的血清型病毒則與其他病毒無任何血清關係；如鳳仙花壞疽斑點病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV)，花生黃斑病毒 (*Peanut yellow spot virus*, PYSV) 及花生黃化扇斑病毒 (*Peanut chlorotic fan-spot virus*, PCFV) 的血清學有別於任何其他 tospoviruses，因此歸類為獨立不同血清型。

2007年，在臺灣中部瓜類作物上進行了田間病毒病害種類調查。在彰化縣大村鄉一處種植胡瓜(品種：達豐二號，穗耕種苗公司種子)設施內，發現類似 tospovirus 病毒引起之病徵，此胡瓜植株，代號記為 TW-C1。在受感染的胡瓜其症狀與 MYSV 在臺灣感染西瓜和在日本 MYSV 感染洋香瓜和苦瓜相似。TW-C1 經過一系列單斑分離和機械接種罹病組織後，病毒被純化分離出後。進一步研究 TW-C1 之寄主範圍，生物學特性，核鞘蛋白血清學反應及反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 和 N 基因序列分析結果顯示，分離胡瓜的病毒(TW-C1) 是一個典型的甜瓜黃斑病毒(MYSV)。這項研究是 MYSV 在臺灣感染黃瓜的首次記錄。

材料與方法

病毒分離及機械接種

採集自彰化縣大村鄉網室胡瓜有黃化壞疽病徵的植株(TW-C1) 葉片，取 1g TW-C1 葉片組織，加入 9 ml 0.01 M 磷酸緩衝液其中含 0.01M 亞硫酸鈉 (pH 7.0)，經研磨後接種於佈滿金鋼砂之健康葵藜葉片上。7 天後在葵藜葉片上產生單斑後，再取單斑經連續三次單斑分離的葵藜葉上單斑，在機械接種於煙草產生系統性病徵之植株，代號為 TW-C1，並繼續維持在煙草上，供為實驗來源。為確認在田間觀察到的病徵是由病毒所造成，取 TW-C1 有黃化壞疽病徵的葉片 1g 放入上述之 0.01M 磷酸緩衝接種液中研磨，研磨後之汁液接種於佈

滿金鋼砂之健康胡瓜苗葉片（品種：達豐 2 號，穗耕種苗公司，台北，臺灣）。所有供試不同種類之接種植物被置於可溫度控制的溫室（25-28°C）觀察記錄病徵的發展(表一)。

此外，2006 年採自臺灣中部苗栗縣的 MYSV 西瓜分離株 (MYSV -TW)，一個由臺灣中部西瓜田分離出之 WSMoV 西瓜分離株，一個在臺灣由海芋分離之海芋黃化斑點病毒(*Calla lily chlorotic spot virus*, CCSV) 分離株，一個由臺灣中部花生田分離之花生黃化扇斑病毒 (PCFV) 分離株，用於試驗之比對。此外還有在美國從大岩桐分離之在高溫度下病徵會消失的番椒黃化病毒 (*Capsicum chlorosis virus*, CaCV)；一個從紐約分離之番茄斑萎病毒 (TSWV) 番茄分離株，以及從荷蘭分離的鳶尾花黃斑病毒 (*Iris yellow spot virus*, IYSV)，將上述 3 種病毒保持活性在系統寄主植物-煙草(*Nicotiana benthamiana*)上用於以後之比較研究。此外，ZYMV 的 TW - TN3 來自臺灣台南，及木瓜輪點病毒-西瓜系統嘉義分離株(PRSV-W-CI)維持在系統寄主植物刺角瓜 *Cucumis metuliferus* (Naud.)，在本文試驗中使用並行評估。

電子顯微鏡 (EM) 觀察

由感染 TW- C1 的胡瓜植株葉片切取塊狀罹病葉組織(大小約 5×5 平方毫米)用牙籤粉碎，10μl 的罹病組織液與等體積的 0.1 M 磷酸溶液含 4%戊二醛 (GA) (pH 值 7.0) 混合後在石蠟膜上固定 3 分鐘。取一滴固定後之罹病葉組織粗汁液於電子顯微鏡觀察用之銅網 (300 目) 上 3 分鐘，後用無菌蒸餾水沖洗 5 次，2%醋酸鈷染色，10 秒，然後以電子顯微鏡觀察。

間接酵素聯結免疫吸附分析試驗 (Indirect ELISA)

用以分析 TW-C1 血清學特性之間接 ELISA 方法是依據之前 Clark and Adam(1977)所發表之步驟稍做修改。四種抗兔多源抗體，ZYMV，PRSV-W，CGMMV 和 CMV 和兩個抗鼠單源抗體 MYSV 和

WSMoV被使用。透明的ELISA 96穴血清盤（德國Greiner公司製）穴壁分別附著有TW-C1葉片組織以50倍附著緩衝液（0.05 M的碳酸鈉，pH值9.6和0.02%疊氮鈉）稀釋之研磨液，置於置於37°C定溫箱反應2.5 hr，反應完倒掉粗汁液，加入洗滌緩衝液

PBST [phosphate buffered saline, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.4] 洗滌3次，再加入以稀釋緩衝液（0.01 M 磷酸緩衝液，pH 值 7.4，含 0.05 % Tween 20 和 0.2% 卵清蛋白）稀釋 2000 倍之 ZYMV，PRSV-W，CGMMV 和 CMV 鞘蛋白多源抗血清或稀釋 10000 倍之 MYSV 及 WSMoV 核鞘蛋白單源抗血清，置於 37°C 定溫箱反應 2.5 小時，反應完倒掉血清，以 P B S T 洗滌 3 次後加入稀釋 5000 倍的鹼性磷酸酵素結合之山羊抗兔子或老鼠抗體之免疫球蛋白 (goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Gove, Pennsylvania)，於 37°C 反應 2.5 小時，最後再以 P B S T 洗滌 3 次，即可加入以基質緩衝液（9.7%和 0.02% 二乙醇胺疊氮化鈉，pH 值 9.8）配製之鹼性磷酸酵素基質溶液呈色 10-60 分鐘，加入 3 M 氫氧化鈉(NaOH) 停止反應，並以 E L I S A 測讀儀 (Bio-Rad 680 ELISA Reader) 記錄其波長 405nm 的光吸收值(A₄₀₅ Value)。

免疫漬染試驗(Immunoblotting)

進行免疫漬染試驗(Immunoblotting)係根據Yeh *et al* (1996)描述的方法。健康胡瓜葉片組織、感染TW- C1的胡瓜葉片組織及健康菸草葉片以3倍量 (V/W) 的分離緩衝液（100 mM的Tris - HCl，pH值7.2，含2%的β-mercaptoethanol，10%的蔗糖，0.005 % 溴酚藍和10 mM EDTA）研磨。將研磨之植物組織粗汁液經高溫處理後以12%的電泳膠(SDS polyacrylamide gel)進行電泳分離後，再將這些蛋白質轉印至預先浸泡於TSW緩衝液（10 mM的Tris- HCl的，pH值7.4，0.9%氯化鈉，0.25%明膠，0.1%的Triton X - 100和2%的SDS）之硝化纖維膜(NC paper)上，轉印時間為1小時；轉印蛋白後之硝化纖維膜再置於MYSV

及WSMoV 抗鼠單源抗體以TSW緩衝液稀釋10000倍之溶液下反應1小時，以P B S T 洗滌3次後繼而將硝化纖維膜置於稀釋5 0 0 0倍的鹼性磷酸酵素結合之山羊抗兔子抗體之免疫球蛋白(goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Gove, Pennsylvania)，於37°C反應1小時，最後再以P B S T 洗滌3次，即可加入含顯色劑(nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate paratoluidine salt)之顯色緩衝液(氯化鈉100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl, pH 9.5)。健康葉片被用來作為試驗對照組。

反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)試驗

使用之引子對依據Lin等人(2007)之報告，選擇在tospoviruses L RNA 及NSm 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)，t2740/t3920及tNSm410/tNSm870c用以進行RT-PCR；另兩組引子對則依據Chen等人(2010)之報告，選擇在MYSV及WSMoV之核鞘RNA上具專一性序列區域，各設計一組引子對，MYSV-N-f / MYSV-N-r(偵測MYSV)及WN2963 / WN3469c(偵測WSMoV)用以進行RT-PCR。從感染TW- C1的植物組織抽取總量RNA的方法是使用Hopegen公司之植物總量RNA微量純化試劑組和RT-PCR 試驗是亦使用Hopegen公司生產之單步驟反轉錄聚合酵素連鎖反應試劑組，使用之步驟及方法根據製造商的操作說明書。單步驟RT-PCR設定第一鏈cDNA的合成，在50°C下30分鐘，並終止了94°C 2 min，然後進行PCR擴增35個循環條件設定為94°C 30秒，58°C 30秒和72°C 1分鐘。取1µl之PCR產物進行膠體電泳分析，並以溴化乙錠(ethidium bromide)染色，再於UV光照箱上檢視。

N基因轉殖和序列分析

以RT-PCR放大含整個N基因的cDNA片段經低融點瓊脂電泳染色後，於UV光照箱上儘快切下放大的片段，置於離心管中，65°C

水浴溶解5分鐘，以酚(phenol) 萃取三次，氯仿(chloroform) 萃取一次，所得上清液以2.5倍的100%酒精及1/10倍的3 M醋酸鈉(sodium acetate, pH 7.0)，於- 80°C 沉降後，經14000 rpm 15分鐘離心(Eppendorf)，所得DNA沉澱物溶於10µl蒸餾水中。經低融點瓊脂電泳法所分得到的cDNA，與載體pCR-TOPO vector (TOPO TA cloning kit, Invitrogen) 進行黏合反應，黏合反應之操作步驟依製造商所提供的說明書。完之DNA再與50µl 大腸桿菌 DH5α (Hoegen) 於玻璃試管中混合均勻，置於冰上30分鐘，迅速以42°C 水浴加熱30秒，之後置於冰上2分鐘，再加125µl SOC培養液(2% tryptone, 5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) 於37°C 震盪培養30分鐘，取此培養液60µl塗於含有50µg/ml安比西林(ampicillin) 之LB平板培養基(1% NaCl, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.5% agar) 上且此平板需先塗上100µl IPTG及40µl 2% X-gal，將此平板置於37°C，16-17小時後，觀察菌落的形成及顏色反應。核苷酸(NT)的序列測定由自動DNA測序系統(ABI377-19; Perkin-Elmer公司應用生物系統公司，福斯特城，加利福尼亞州)。推導的氨基酸(AA)序列被翻譯使用Sixframe程式中的Biology WorkBench 3.2版(<http://workbench.sdsc.edu>)。核苷酸和氨基酸序列分析使用NCBI的基本局部比對搜索工具(BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

結 果

胡瓜的病徵：

在田間，發病的胡瓜首先注意到新葉出現類似由病毒所造成之嵌紋病徵。後來，病勢發展在成熟葉片造成黃化，然後與鄰近的黃色斑點互相融合，形成大的黃化壞疽斑點，葉片逐漸壞死。在後期階段，病株會有嚴重矮化症狀與節間縮短的狀況(圖一A和B)。

病毒分離及回接試驗：

從田間取得之黃化嵌紋胡瓜植株，代號記為 TW- C1，經連續三次在葵藜葉片上單斑分離後，將病斑機械接種於健康煙草及胡瓜葉片上，置於網室觀察病徵發展並供為實驗材料。葵藜機械接種 TW- C1 葉片粗汁液後 4-5 天，葉片出現壞疽斑點（圖一 C）。此外，TW- C1 還在接種植物-菸草(*N. benthamiana*)植株及葉片上出現萎凋、嵌紋病徵（圖一 D）。為了證實 TW- C1 是由病毒所造成，將 TW-C1 粗汁液機械接種至八個胡瓜品種幼苗，包括達豐 2 號，和生 1 號，河童盛夏，喜燕，夏艷，夏迪，尚綠，尚青。接種 10-14 天後，接種胡瓜幼苗各品種第一接種子葉表現壞疽及輪斑症狀，新展開的葉片出現褪綠斑駁嵌紋症狀（圖一 E）。最後，上部葉片顯示黃色斑點和壞死的症狀與田間發現之病徵相似。（圖一 A 和 B）。後來該褪綠黃化斑點逐漸覆蓋了整個葉片，最後導致壞死，葉片畸形等。

病毒形態：

從田間自然感染的胡瓜植株葉片組織利用陰染法電子顯微鏡觀察。從電顯陰染罹病葉片組織樣品觀察到有球形病毒顆粒存在，測量直徑約 70-110 nm。同樣大小的病毒顆粒也可利用電子顯微鏡在 TW- C1 機械接種健康胡瓜幼苗葉片上觀察到（圖二）。就電子顯微鏡觀察推斷此類似病毒引起胡瓜葉片黃化、壞疽及嵌紋病徵的病原，有可能是一個番茄斑萎病毒屬病毒(tospovirus)。

利用血清學和核酸序列分析確認 TW - C1 為 MYSV 之胡瓜分離株：

對於感染 TW - C1 的胡瓜罹病組織進行血清學分析試驗，使用可偵測 4 種瓜類病毒 ZYMV、PRSV-W、CGMMV 及 CMV 之抗兔多源血清及可偵測 2 種瓜類病毒 MYSV、WSMoV 之抗鼠單源血清以間接 ELISA(Indirect ELISA)技術鑑定 TW- C1 與這 6 種常見之瓜類病毒血清學之關係。Indirect ELISA 試驗結果顯示 TW-C1 罹病組織粗汁液僅與 MYSV 抗鼠單源血清有陽性反應，但與 WSMoV 抗鼠單源血清及

ZYMV、PRSV-W、CGMMV 及 CMV 之抗兔多源血清無血清學反應（圖三）。另一方面，胡瓜苗機械接種 TW - C1 出現病徵後進一步以免疫漬染法(Immunoblotting)檢測。試驗結果顯示 MYSV 核鞘蛋白的抗鼠單源抗體與感染 TW - C1 的胡瓜幼苗及早先以確認為 MYSV，分離自苗栗縣的西瓜分離株(MYSV - TW)有強烈的反應（圖四）。有一個 30 kDa 蛋白在感染 TW - C1 的胡瓜植株粗汁液與 MYSV 核鞘蛋白的抗鼠單源抗體有強烈的反應（圖四）。

此外，Tospovirus 屬簡併式引子對 tNSm410/tNSm870c 和 t2740/t3920c 用於 RT - PCR 檢測，由感染 TW - C1 胡瓜苗抽取之總量 RNA 樣本中，tNSm410/tNSm870c 和 t2740/t3920c 引子對分別可擴增出 0.5 kb 和 1.2 kb 的 DNA 片段(圖五 A 和 B)，而對照組 MYSV-TW 及 WSMoV-TW RT-PCR 試驗也獲得與 TW-C1 相同的結果。的擴增引物對，分別為。相應的擴增也獲得了，荃灣和 WSMoV - tw 的感染植物組織。沒有擴增時，獲得總 RNA 提取的植物或植物健康的單獨感染其他測試 tospoviruses。我們的研究結果血清學檢測和 RT - PCR 表明，TW - C1 是 *Tospovirus* 屬內之甜瓜黃斑病毒(MYSV)，是一個在胡瓜上發現之甜瓜黃斑病毒，暫記為 MYSV - TW-C1。為了更準確地確定 MYSV-TW-C1 分類地位，病毒 N 基因的擴增引子對 MYSV-Nf/MYSV-Nr 被運用於 RT - PCR 試驗（圖五 C 和 D）。被放大的 N 基因 DNA 片段大小約 0.9 kb 轉殖後解序。序列分析表明，N 基因的 MYSV - TWC1 核苷酸序列與採自臺灣中部西瓜的 MYSV - TW（登錄號碼：FJ386391）有 99% 相似度；而且與有記錄之 MYSV 國外分離株例如日本分離株（登錄號 AB038343 和 AB024332）和泰國分離株（登錄號 AY673636 和 AY574574）也有 98% 的同源性。

討 論

因為病徵的高變異性和廣泛的寄主範圍，分類 tospoviruses 是因

難的。而寄主反應，核鞘蛋白的血清學關係和媒介昆蟲專一性是非常重要的鑑定 *tospovirus* 關鍵。2007 年在中部地區進行的田間調查，一個在胡瓜葉片出現黃化壞疽斑點及嵌紋類似病毒病徵的植株被發現，代號為 TW- C1。利用電子顯微鏡觀察發現 TW-C1 葉片粗汁液內有直徑 70 至 110 nm 的球形顆粒，其大小與典型的 *tospoviruses* 相符。使用 *Tospovirus* 屬簡併式引子，進行對 TW-C1 之 RT - PCR 擴增試驗，証實 TW- C1 是 *Tospovirus* 屬成員。據前人之研究得知，雖然 MYSV 可與 WSMoV NP 抗血清反應在西方墨點法 (western blotting) 和酵素聯結免疫吸附試驗 (ELISA) 試驗；但由中興大學植物病理系葉錫東教授實驗室所製作之 MYSV 及 WSMoV 抗鼠單源抗體，這兩個 *tospoviruses* 可以明確區分開來。運用這兩個抗鼠單源抗體在血清學分析顯示，TW- C1 的抗原抗僅與 MYSV 核鞘蛋白抗鼠單源抗體反應。我們的研究結果表明，TW- C1 是一個 MYSV 胡瓜上的分離株，因此記為 MYSV- TW-C1。

為了進一步驗證這一 *tospovirus* 是否為 MYSV，MYSV N 基因專一性引子對(MYSV- N-f 和 MYSV-N-r)被用來進行 RT-PCR 試驗，結果從 MYSV- TWC1 感染植株的總量 RNA 樣品中擴增出一 DNA 片段，大小約 0.85 kb；而 WSMoV N 基因專一性引子對(WN2963 和 WN3469c)同樣也用於 RT - PCR 技術擴增 MYSV- TWC1 感染植株之總量 RNA 樣品，結果沒有任何 DNA 片段被擴增。RT - PCR 的結果證實了我們血清學檢測結果，並證明運用 WSMoV 及 MYSV 抗鼠單源抗體可以運用於田間檢測這兩種病毒。比較 N 基因序列，MYSV- TW-C1 與那些不同國家不同菌株的 MYSV 核苷酸序列比較，結果表明 MYSV- TWC1 與 2006 年另一個臺灣西瓜分離株(MYSV- TW)是密切相關的，核苷酸相同度在 99%，與日本和泰國不同 MYSV 分離株比較，核苷酸之相同度亦有 98%。MYSV 似乎遍及臺灣現在被認為是一種新興的瓜類作物生產限制因素之一。在日本有研究指出，原產

地來自 26 個國家有 398 個胡瓜品種，機械接種甜瓜黃斑病毒(MYSV)至這些品種之胡瓜苗，結果發現並沒有免疫或高抗 MYSV 之品種被發現。以前的研究表明，高溫會促進症狀表現和病毒蔓延。我們也嚐試接種八個在臺灣市面上常見之商業胡瓜品種，篩選抗 MYSV 的胡瓜品種結果也顯示這 8 個品種都容易被 MYSV-TW-C1 感染。由於所有的商業胡瓜品種都是 F1 雜種，所以他們的父母本，亦需要進一步檢驗。此外，國外引進之胡瓜品種也需要進行篩選，也許會有抗病或抗病的品種被檢出。

參考文獻

1. Chen T.C., Huang C.W., Kuo Y.W., Liu F.L., Hsuan Yuan C.H., Hsu H.T. and Yeh SD, 2006. Identification of common epitopes on a conserved region of NSs proteins among tospoviruses of *Watermelon silver mottle virus* serogroup. *Phytopathology* 96: 1296-1304.
2. Chen, T. C., Lu, Y. Y., Cheng, Y. H., Chang, C. A. and S. D. Yeh. 2008. Melon yellow spot virus in watermelon: a first record from Taiwan. *Plant Pathol.* 57: 765-765.
3. Chiemsombat, P., Gajanandana, O., Warin, N., Hongprayoon, R., Bhunchoth, A. and Pongsapich, P. 2008. Biological and molecular characterization of tospoviruses in Thailand. *Arch. Virol.* 153: 571-577.
4. Chu, F. H., Chao, C. H., Chung, M. H., Chen, C. C., & Yeh, S.D. 2001. Completion of the genome sequence of Watermelon silver mottle virus and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. *Phytopathology* 91 : 361–368.
5. Chung, M. H. 2002. Assessment of the variability of different isolates of Watermelon silver mottle virus occurring in Taiwan. Master Thesis, National Chung Hsing University.

6. Clark, M. F., & Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34 : 475–483.
7. Jan, F. J., Chen, T. C., & Yeh, S. D. 2003. Occurrence, importance, taxonomy and control of thrips-borne tospoviruses. In: H. Huang, & S. N. Acharya (eds.) *Advances in Plant Disease Management* (pp. 391–411). India: Research Signpost.
8. Kato, K., Hanada, K., & Kameya-Iwaki, M. 1999. Transmission mode, host range and electron microscopy of a pathogen causing a new disease of melon (*Cucumis melo*) in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 65 : 624–627.
9. Kato K, Hanada K, Kameya-Iwaki M, 2000. *Melon yellow spot virus: A distinct species of the genus Tospovirus isolated from melon.* *Phytopathology* 90 : 422-426.
10. Law, M. D., & Moyer, J. W. (1990). A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *J. Gen. Virol.* 71 : 933–938.
11. Milne, R. G. 1970. An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in sections of infected cell and in negative stain preparation. *J. Gen. Virol.* 6: 267-276.
12. Moyer, J.W. (2000). Tospoviruses. Pages 592-597 in *Encyclopedia of Microbiology*. Vol 4. R. Hull ed. Academic Press. London.
13. Okuda M, Takeuchi S, Taba S, Kato K, Hanada K (2002) melon yellow spot virus and watermelon silver mottle virus: outbreak of cucurbit infecting tospovirus in Japan. *Acta Hort.* 588: 143–148
14. Pang, S. Z., Slightom, J. L., & Gonsalves, D. (1993). The biological properties of a distinct tospovirus and sequence analysis of its S RNA. *Phytopathology* 83 : 728–733.

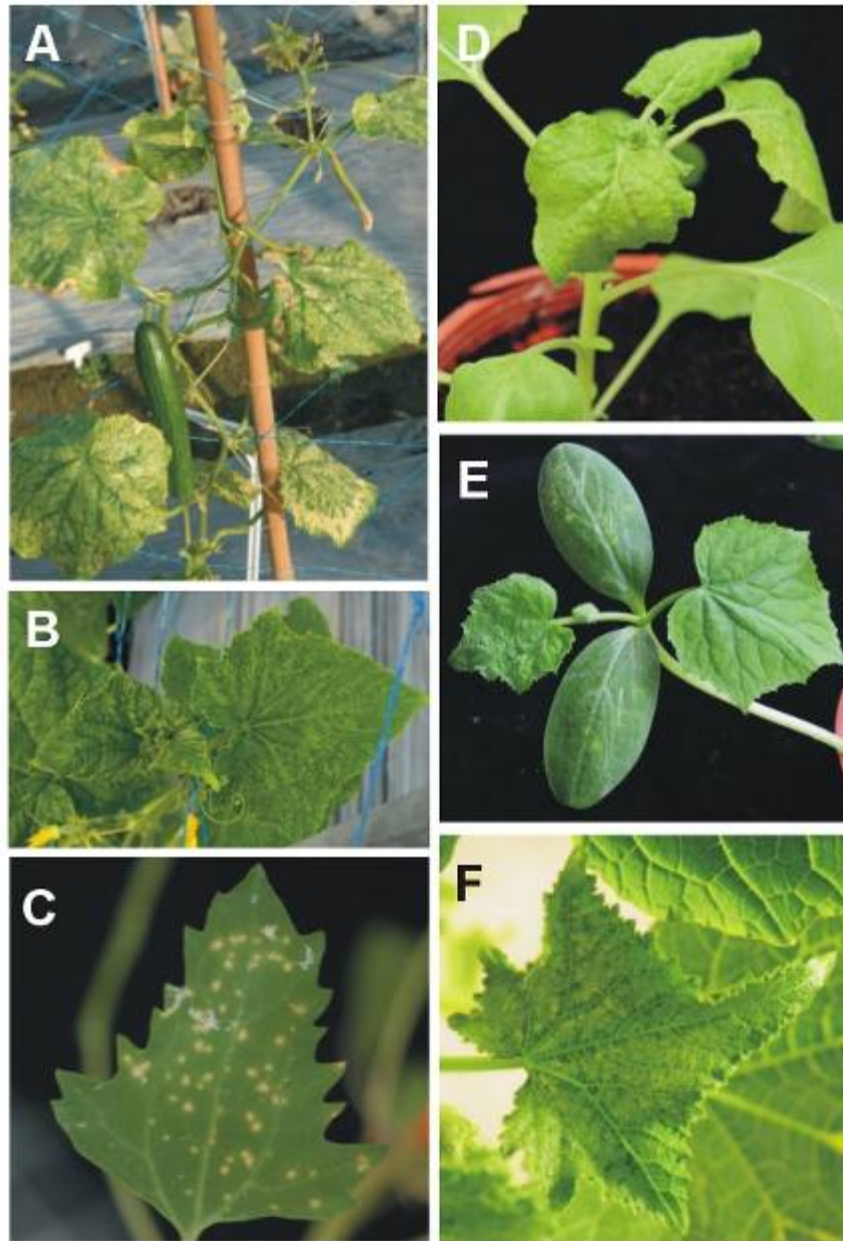
15. Pongsapich, P., & Chiemsombat, P. (2002). Characterization of tospovirus infecting tomatoes in Thailand revealed the presence of serogroup IV-tospovirus but not serogroup I tomato spotted wilt virus. Paper presented at the 1st International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases, Chiang Mai, Thailand.
16. Sugiyama, M., Okuda, M. and Sakata, Y. 2009. Evaluation of resistance to melon yellow spot virus in a cucumber germplasm collection. *Plant Breed.* 128(6) : 696-700.
17. Takeuchi, S., Okuda, M., Hanada, K., Kawada, Y. and Kameta-Iwaki, M. 2001. Spotted wilt disease of cucumber (*Cucumis sativus*) caused by Melon yellow spot virus. *Jpn. J. Phytopathol.* 67 : 46-51.
18. Takeuchi, S., Shimomoto, Y., Ishikawa, K. 2009. First report of Melon yellow spot virus infecting balsam pear (*Momordica charantia* L.) in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 75(2) : 154-156.
19. Sugiyama, M., Yoshioka, Y. and Sakata, Y. 2009. Effect of temperature on symptom expression and viral spread of Melon yellow spot virus in resistant cucumber accessions. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:381-387.
20. Yeh, S. D., Chao, C. H., Cheng, Y. H. and Chen, C. C. 1996. Serological comparison of four distinct tospoviruses by polyclonal antibodies to purified nucleocapsid proteins. *Acta Hort.* 431 : 122–134.
21. Yeh, S. D., Cheng, Y. H., Jih, C. L., Chen, C. C. and Chen, M. J. 1988. Identification of tomato spotted infecting horn melon and watermelon. *Plant Prot. Bull.* 30:319-420.
22. Yeh, S. D., Lin, Y. C., Cheng, Y. H., Jih, C. L., Chen, M. J., & Chen, C. C. 1992. Identification of tomato spotted wilt like virus infecting watermelon in Taiwan. *Plant Dis.* 76 : 835–840.

表一、從中部地區胡瓜田分離類似番茄斑萎病毒屬病毒(TW-C1)不同寄主之病徵表現。

Table 1. Host range of a tospovirus-like virus (TW-C1) isolated from diseased cucumber in central Taiwan

Family	Species	Symptoms*	
		Inoculated leaves	Upper leaves
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i> L.	NS	—
<i>Brassicaceae</i>	<i>Brassica chinensis</i> L.	—	—
	<i>Raphanus sativus</i> L.	—	—
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i> L.	YS	—
	<i>C. quinoa</i> Willd.	NS, YS	—
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Benincasa hispida</i> (Thunb.) Cogn.	Y, M	M
	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsun & Nakai.	Y, M	M,NS
	<i>Cucumis metuliferus</i> E. Mey. Ex Naud.	Y, M	M
	<i>C. sativus</i> L.	Y, M	M
	<i>C. melo</i> L.	Y, M	M
<i>Solanaceae</i>	<i>Datura stramonium</i> L.	CS	M, NS
	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	YS	M, NS
	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.	YS, M	M
	<i>N. glutinosa</i> L.	NS	—
	<i>N. rustica</i> L.	NS	—
	<i>N. tobacum</i> cv. Hicks.	NS	—
	<i>Petunia hybrid</i> Hort. ex Vilm	YS	—
<i>Leguminosae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	YS	—
	<i>Vigna sesquipedalis</i> (L.) Fruwirth	NS	—

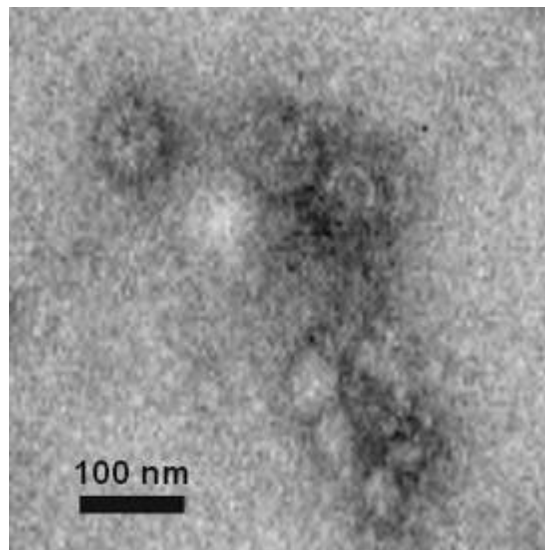
*Symptoms are abbreviated as follows: NS, necrotic spots; CS, chlorotic spots; M, mosaic; Y, yellowing; YS, yellow spot; —, no symptom.



圖一、罹染甜瓜黃斑病毒在胡瓜上之病徵。(A)胡瓜葉片上出現黃化、壞疽及嵌紋病徵。(B)胡瓜上位葉出現嵌紋病徵。(C)機械接種至局部斑點寄主葵藜，5-7 天後出現局部壞疽病斑。(D) 機械接種至系統寄主煙草，12-14 天出現嵌紋病徵。(E) 田間胡瓜有黃化壞疽嵌紋之葉片經研磨後機械接種至健康胡瓜苗葉片，10-12 天後，葉片上出現黃化及嵌紋病徵。(F) 利用南黃薊馬傳播 TW-C1 試驗，10 天以後健康胡瓜苗出現嵌紋病徵。

Fig. 1. Symptoms induced by Melon yellow spot virus (MYSV) on

cucumber. (A) Necrotic spots, yellowing and mosaic on leaves of a cucumber plant putatively infected with a virus in field greenhouse. (B) Symptoms observed on the upper leaves of an infected cucumber plant. (C) Local lesions induced on a leaf of *Chenopodium quinoa* inoculated with the crude sap extracted from the diseased cucumber plant. (D) Systemic symptoms on a plant of *Nicotiana benthamiana* inoculated with the virus isolate TW-C1 obtained from single-lesion isolation. (E) Cucumber seedlings inoculated with the virus isolate TW-C1 showing yellow spots and mosaic symptoms on cotyledons and true leaves. (F) Mosaic symptoms appeared on a systemic leaf of cucumber seedling after inoculation with the virus isolate TW-C1 by the vector *Thrips palmi*.



圖二、電子顯微鏡觀察田間類似遭病毒危害之胡瓜植株葉片(TW-C1) 樣品。

Fig. 2. Transmission electron micrograph of nearly spherical particles with envelope (70-110 nm diameter) in cucumber leaf sap from a TW-C1-inoculated cucumber plant. After fixation with 4% (v/v)

glutaraldehyde, leaf sap was placed on a collodion coated grid and negatively stained with 2% (w/v) phosphotungstic acid. The bar represents 100 nm.

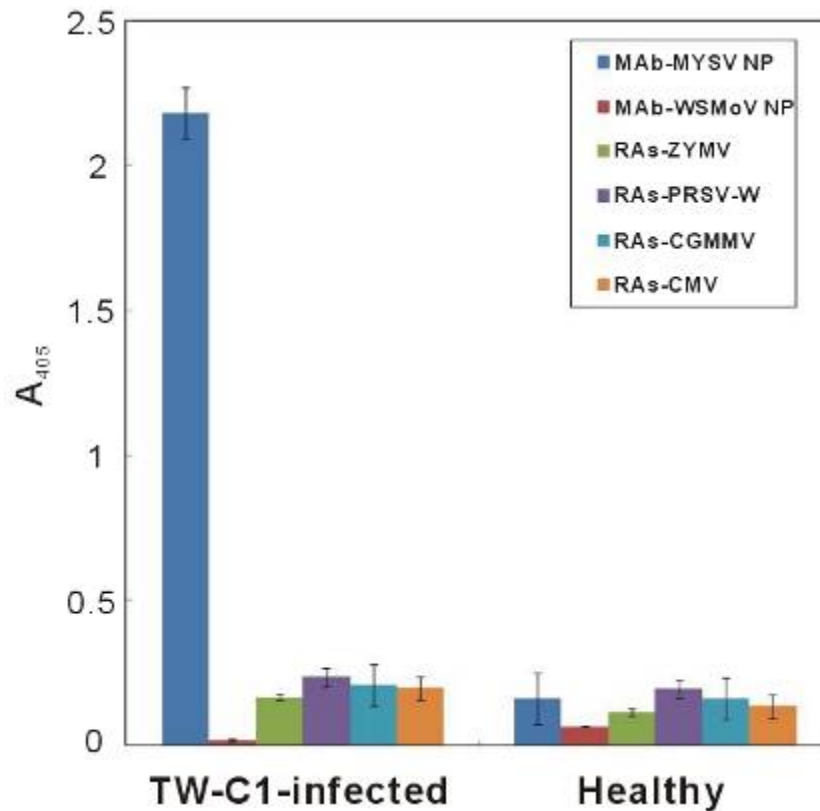


圖 3、健康胡瓜苗及罹染 TW-C1 胡瓜苗之酵素聯結免疫反應分析試驗。

Fig. 3. Enzyme-linked immunosorbent assay of leaf extracts prepared from TW-C1-infected or healthy cucumber plants. Following incubation with the extracts, microfilter plates were individually incubated with specific rabbit antiserum (RAs) to ZYMV, PRSV-W, CGMMV or CMV and monoclonal antibody (MAb) to MYSV or WSMoV⁽²⁶⁾, and followed by alkaline phosphatase-labeled goat anti-rabbit and goat anti-mouse immunoglobulin, respectively. Absorbance at 405 nm was recorded 30 min after the addition of the substrate \square -nitrophenyl phosphate. Readings represent the averages from eight samples.

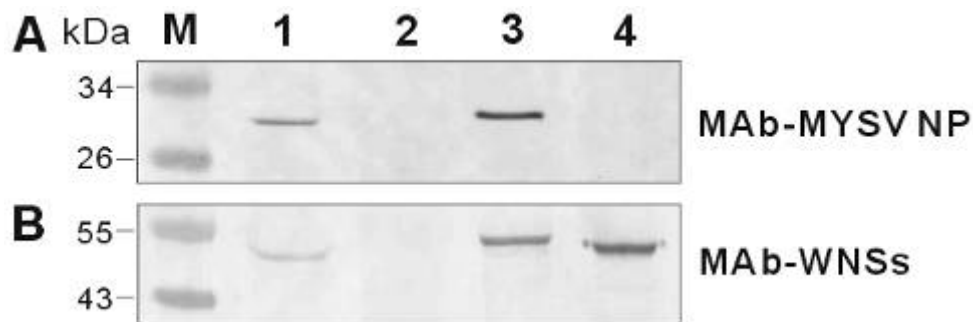


圖 4、罹染 TWC1 胡瓜苗樣品利用 MYCV 核鞘蛋白及 WSMoVWNSs 之抗鼠單源抗體之免疫漬染試驗

Fig. 4. Immunoblotting analysis of plants infected with TW-C1 using the monoclonal antibody (MAb) to the nucleocapsid protein (NP) of Melon yellow spot virus (MYCV) (A) and the MAb-WNSs to the NSs proteins of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV)-serogroup tospoviruses (B). Equal amounts (5 μ l) of extracts from leaf tissues (0.05 g/500 μ l) collected at 7 days after inoculation (0.5 cm diameter of disk from three different leaves ground in 500 μ l extract buffer) were loaded in each lane. M, prestained protein markers. Lane 1, a cucumber plant infected with TW-C1. Lane 2, an uninfected cucumber plant. Lane 3 and 4, the plants of *Nicotiana benthamiana* infected with MYCV-TW and WSMoV-TW, respectively.

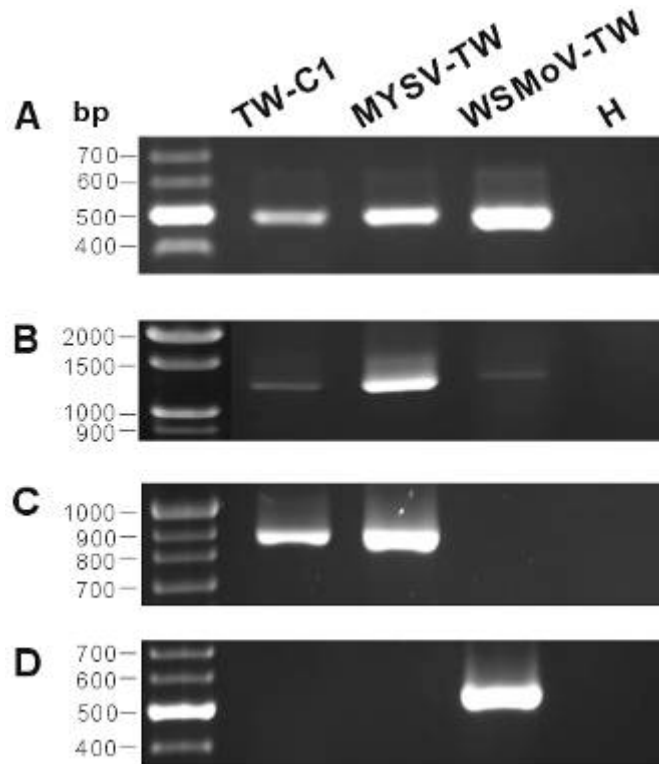


圖 5、利用 Tospovirus 屬簡併式引子對及 MYSV、WSMoVT 專一性引子對 TW-C1 胡瓜植株之反轉錄酵素連鎖反應(RT-PCR)試驗。

Fig. 5. Detection of the cucumber virus isolate TW-C1 by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using *Tospovirus* genus-universal and species-specific primers. (A) Degenerate primer pair tNSm410/tNSm870c designed from the conserved region of NSm genes, (B) degenerate primer pair t2740/t3920c designed from the conserved region of L genes, (C) specific primer pair MYSV-N-f/MYSV-N-r designed from the nucleocapsid (N) gene of Melon yellow spot virus (MYSV), and (D) specific primer pair WN2963/WN3469c designed from the N gene of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) were used for RT-PCR. Total RNAs extracted from a healthy plant of *Nicotiana benthamiana* (H) and a plant infected with MYSV-TW or WSMoV-TW were used for comparison.