

# 葫蘆科種子 *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV) 之檢測技術建立

## Establishment of Detection Techniques for *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV) in Cucurbit Seed

馮雅智<sup>1</sup>、王慧如<sup>2</sup>、林祥智<sup>2</sup>、邱燕欣<sup>3</sup>

### 一、全球葫蘆科種子感染病毒概況

大多數植物的繁殖都經由種子，而種子卻是多種植物病原的初始帶毒來源 (Sastry 2013)，尤其是多種病毒病害可經由種子隨著全球種子貿易的流通而散播，成為國際種子貿易之非關稅障礙之因。以地中海地區為例，已報導 28 種對葫蘆科植物具破壞性的病毒，其中 *Tobamovirus* 具高種傳率，影響多種重要蔬菜作物特別是茄科與葫蘆科作物，被視為全球重要的風險因子。目前在 *Tobamovirus* 屬中正式記錄的病毒共有 37 種 (Adams *et al.*, 2017)，其中有一專門感染葫蘆科作物的亞群，包括胡瓜綠斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)、黃瓜綠斑嵌紋病毒 (*Kyuri green mottle mosaic virus*, KGMMV)、胡瓜果實斑駁嵌紋病毒 (*Cucumber fruit mottle mosaic virus*, CFMMV)、櫛瓜綠斑嵌紋病

毒 (*Zucchini green mottle mosaic virus*, ZGMMV)、胡瓜綠斑病毒 (*Cucumber mottle virus*, CuMoV)、西瓜綠斑嵌紋病毒 (*Watermelon green mottle mosaic virus*, WGMMV) 及栝樓嵌紋病毒 (*Trichosanthes mottle mosaic virus*, TrMMV) 共 7 種病毒，當中 CGMMV、KGMMV、CFMMV 與 ZGMMV 為現今全球關注的葫蘆科種傳病毒，各國分別祭出輸入種子的檢疫條件以防堵病毒入侵加以因應，例如紐西蘭 2016 年公告種植用輸入葫蘆科種子需於輸出國植物檢疫證明書加註未罹染 CGMMV 與 KGMMV；澳大利亞則於 2020 年新增 8 種葫蘆科種植用種子需於輸出國簽發之植物檢疫證明書加註「經取樣 9,400 粒種子或少量種子之 20%，以 ELISA 檢測確認未罹染 CGMMV、KGMMV、MNSV 與 ZGMMV 等 4 種病毒」使得輸入。

<sup>1</sup> 種苗改良繁殖場種苗檢驗科 助理研究員

<sup>2</sup> 種苗改良繁殖場 種苗檢驗科 約用人員

<sup>3</sup> 種苗改良繁殖場 種苗檢驗科 副研究員兼科長

KGMMV 最早於 1967 年的日本 Tokushima 黃瓜田區發現，"Kyuri" 即為日文黃瓜之意，因而稱之 (Inouye *et al.* 1967)。近年來，已有多篇報導指出 KGMMV 在多個國家對葫蘆科作物造成嚴重產量損失，其中位居全球胡瓜、甜瓜、西瓜與南瓜的十大生產國之一的土耳其，於 2023 年首次報導葫蘆科作物感染 KGMMV，檢測結果顯示病毒感染率最高為甜瓜 (45%)，其次為胡瓜 (25%) 與南瓜 (10%)，無論當地境內或進口的種子批次皆可檢出 KGMMV，尤其是源自北非與南美洲的種子，突顯 KGMMV 對商業種子批次的潛在風險。目前 KGMMV 也於韓國 (Lee *et al.*, 2000) 與印尼 (Daryono *et al.*, 2005) 報導發生。以下針對 KGMMV 特性與檢測方法進行論述。

## 二、KGMMV 概述

### (一) 病毒特性

KGMMV (*Tobamovirus kyuri*) 屬於 Virgaviridae，正股單鏈 RNA 病毒，具典型棒狀病毒外形，基因體長度約為 6.4 kb，

與其他 *Tobamovirus* (如 *Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) 有高度的序列與生物性相似性。

### (二) 寄主範圍

KGMMV 主要感染葫蘆科 (Cucurbitaceae) 作物，包括胡瓜 (*Cucumis sativus*)、甜瓜 (*Cucumis melo*)、西瓜 (*Citrullus lanatus*) 等。部分研究指出，KGMMV 亦可感染某些非商業作物，可能為田區之潛在病毒來源或中間寄主。

### (三) 造成病徵

KGMMV 感染甜瓜後葉片出現嵌紋、斑駁、黃斑或變形及植株生長停滯等情況 (圖 1)。果實表皮出現黃化、變形，商品價值降低；嚴重時導致全株萎凋，生產損失可達 50% 以上。與其他 *Tobamovirus* 病毒造成的病徵相似，田間難以肉眼區辨。

### (四) 種子傳播 KGMMV 能力

一般而言 *Tobamovirus* 的病毒特性具種傳性 (seed-borne)，可透過受感染植株所產下的種子進行垂直傳播，並於後續播

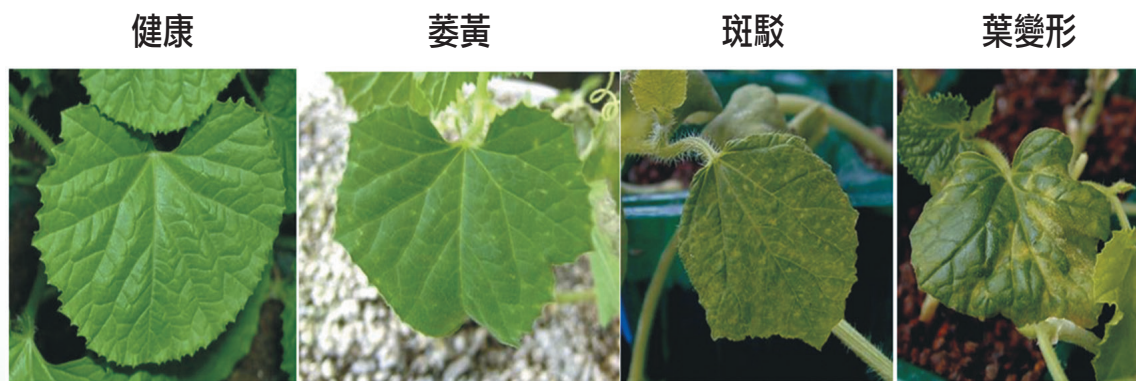


圖 1. 甜瓜感染 KGMMV-YM 系統 (Indonesia isolate) 後之病徵發展

# 研究成果

種、育苗過程中造成初期感染源的建立。此外，此病毒在外界環境中具有極高的穩定性，可透過污染的種子表面或胚內殘留、人員、機械、工具、育苗盤等操作傳播。Balsak (2023) 研究中指出將種子進行出芽測試 (grow-out test)，育成 1000 株胡瓜、1800 株甜瓜與 800 株夏南瓜植株，根據 Gibbs 與 Gower (1960) 所提出的公式進行計算，胡瓜種子在子葉期與本葉期的種子傳播率分別為 2.3% 與 0.5%；甜瓜種子的傳播率則為子葉期 1.1%、本葉期 0.5%；而在夏南瓜的發芽試驗中，未檢出病毒感染的幼苗。儘管 KGMMV 在胡瓜與甜瓜種子中可種子帶毒，但實際的種子傳播率相對偏低，推測在種子發芽過程中，病毒感染的種皮與幼苗接觸是造成子葉與本葉感染的主要原因，另外根據育苗試驗結果，KGMMV 也可由種子機械性傳播至幼苗。然而，這些數據尚不足以說明 KGMMV 的種子傳播機制。

## 三、葫蘆科種子 KGMMV 檢測案例

種苗場於 2013 年起受防檢署委託執行輸出種子植物病原檢測業務，其中 CMV 與 CGMMV 為葫蘆科病毒中經財團法人全國認證基金會 (Taiwan Accreditation Foundation, TAF) 認證檢測標的項目，可開立具有 TAF 認證標誌的檢測報告書，將檢測結果加註於輸出植物檢疫證明書以協助國內種子業者種子輸出。盤點這些年業者委託場內執行的葫蘆科種子病原檢測項目共 13 項包括 1 項真菌、3 項細菌及 7 項病毒以及 2024 年起受業者委託再新增 2 項

病原檢測項目為 MNSV 與 KGMMV，本場已分別建立 ELISA 與 RT-PCR 檢測方法以協助業者將種子輸出至紐西蘭、澳大利亞及哥斯大黎加等國。KGMMV 的檢定方法如下：

### (一) 酵素連結抗體法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

KGMMV ELISA 抗體套組與正、負對照購自 Agdia (USA)，進行雙層抗體夾心酵素連結抗體法 (DAS-ELISA)，利用抗體與抗原專一性結合特性，最終呈色利用 ELISA 讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈 405 nm 之吸收值而判斷樣本的罹染病毒與否，當樣本吸光值 (A<sub>405/492nm</sub>) 為健康對照平均值的兩倍以上，即視為陽性判定為檢出。動植物防疫檢疫署依輸出國規範之檢疫數量取樣種子寄送至本場進行檢測，如輸入紐西蘭之葫蘆科種子需依據國際種子檢查協會制定之檢測規範 (International Rules for Seed Testing 2025 : 7-026) 取樣 2,000 粒種子檢測 CGMMV、KGMMV 等項目。

#### 1. 種子直接研磨檢測

業者委託之檢測種子樣本收到後分成 20 個次樣本 (每次樣本 100 粒)，每個種子次樣本加入 1 倍萃取緩衝液後進行敲打研磨，完成後取上清液進行 ELISA 檢測。

#### 2. 種子 Grow-out 檢測

業者委託之種子樣本播種 2 盤，每盤各有 100 顆種子，放入 26°C 生長箱生長育苗 (圖 2)。待 10 天第一片本葉完

全展開後，分別採集子葉及本葉共 4 樣本進行 ELISA 檢測。

批種子以種子直接研磨或種子 Grow-out 檢測皆未檢出，植株子葉及本葉亦沒任何病徵（圖 3）。在 ISTA 種子病毒檢測規範中提及，DAS-ELISA 檢測法可同時偵測樣本中具感染性與非感染性的病毒顆粒，因此可能導致偽陽性結果，造成病毒傳播率的高估。因此，DAS-ELISA 檢測可作為攜帶病毒種子批



圖 2. 將胡瓜種子樣本播種 2 盤，置於 26°C 生長箱生長育苗

次的初步篩選工具，若呈陽性結果應進一步以同一批次樣本種子進行出芽試驗來確認。

(二) 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)

以 RNase Plant Mini Kit 進行正、負對照樣本核酸萃取，參考國際期刊針對鞘蛋白基因設計之 KGCP-F/KGCP-R 引子對 (Kim et al. 2009) 進行 RT-PCR 反應測試，電泳分析後於 484 bp 處可見增幅條帶即視為陽性判定為檢出。結果顯示僅正對照樣本在預期片段有增幅條帶 (圖 4)。為進一步確認條帶專一性，將 RT-PCR 產物經雙向定序，所得序列 484 bp，在 NCBI 比對後顯示與 2023 年土耳其 Cucurbita pepo 感染 KGMMV (Accession No. OQ915137) 的相似度達最高為 100% (484/484bp) (圖 5)，表示此引子對可專一性辨識 KGMMV，當樣本以 ELISA 呈陽性反應時，可用 RT-PCR 進行雙重確認。



圖 3. 胡瓜種子樣本分別播種 2 盤，子葉及本葉皆未有任何病徵

# 研究成果

## 四、結語與討論

KGMMV 目前在臺灣尚無發生紀錄，被列為我國植物檢疫規範中乙、十「有條

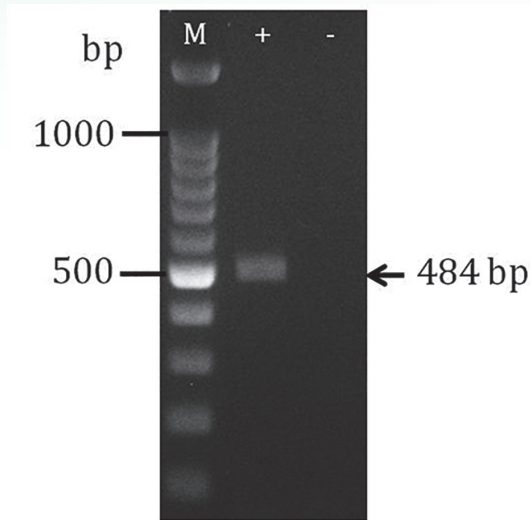


圖 4. 正、負對照樣本核酸萃取後，以 KGCP-F/KGCP-R 引子對（鞘蛋白基因）進行 RT-PCR 反應測試；箭頭處為預期增幅的片段

件輸入植物或植物產品之檢疫條件」檢疫有害生物，其輸入需經適當檢疫處理確認無毒後方可進口，否則須退運或銷毀。KGMMV 為 Tobamovirus 屬的重要成員之一，全球漸漸已有疫情，對作物造成減產，具有高度檢疫關注風險。防範其傳播的關鍵在於使用無特定病原種子（specific pathogen-free, SPF），並可透過種子消毒程序有效降低帶毒率。根據美國 USDA-ARS 建議，針對可能帶毒 CGMMV/KGMMV 的種子處理方式包括熱處理（72°C 持續 72 小時）、化學處理（如使用 10% 三磷酸鈉、0.5-1.0% 鹽酸、0.3-0.5% 次氯酸鈉、10% 磷酸鈉）與綜合處理（先以 10% TSP 浸泡後再進行熱處理）等措施，可提供我國葫蘆科種子之消毒處理，以降低病毒隨種子傳播之風險。

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Kyuri green mottle mosaic virus isolate SQ1 coat protein gene, partial cds	Kyuri green mottl...	894	894	100%	0.0	100.00%	484	<a href="#">OQ815137.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus replicase (131 and 189 kDa), cp, and mp genes	Kyuri green mottl...	894	894	100%	0.0	100.00%	6514	<a href="#">AJ295948.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus cp gene for coat protein, genomic RNA	Kyuri green mottl...	894	894	100%	0.0	100.00%	510	<a href="#">AJ252162.2</a>
Kyuri green mottle mosaic virus, complete genome	Kyuri green mottl...	894	894	100%	0.0	100.00%	6514	<a href="#">NC_003610.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus isolate CM3 coat protein gene, partial cds	Kyuri green mottl...	889	889	100%	0.0	99.79%	484	<a href="#">OQ815131.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus isolate MN4 coat protein gene, partial cds	Kyuri green mottl...	889	889	100%	0.0	99.79%	484	<a href="#">OQ815135.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus isolate MN5 coat protein gene, partial cds	Kyuri green mottl...	889	889	100%	0.0	99.79%	484	<a href="#">OQ815136.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus isolate SQ2 coat protein gene, partial cds	Kyuri green mottl...	889	889	100%	0.0	99.79%	484	<a href="#">OQ815138.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus isolate sq-GN capsid protein (CP) gene, complete cds	Kyuri green mottl...	889	889	100%	0.0	99.79%	486	<a href="#">MN593026.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus isolate CM1 coat protein gene, partial cds	Kyuri green mottl...	889	889	100%	0.0	99.79%	484	<a href="#">OQ815129.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus cp gene for coat protein, complete cds, isolate: KOM	Kyuri green mottl...	889	889	100%	0.0	99.79%	486	<a href="#">AB433895.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus isolate CM2 coat protein gene, partial cds	Kyuri green mottl...	889	889	100%	0.0	99.79%	484	<a href="#">OQ815130.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus genes for movement protein and coat protein, complete cds, strain C	Kyuri green mottl...	883	883	100%	0.0	99.59%	1279	<a href="#">AR015144.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus isolate MN1 coat protein gene, partial cds	Kyuri green mottl...	872	872	100%	0.0	99.17%	484	<a href="#">OQ815132.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus Saga_Kawasoe_2007 genes for RNA-dependent RNA polymerase, movement...	Kyuri green mottl...	856	856	100%	0.0	98.55%	1637	<a href="#">LC649924.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus Miyazaki_Miyazaki-3_2008 genes for RNA-dependent RNA polymerase, move...	Kyuri green mottl...	839	839	100%	0.0	97.93%	2271	<a href="#">LC649929.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus Miyazaki_Mz3_2010 genes for RNA-dependent RNA polymerase, movement pr...	Kyuri green mottl...	800	800	100%	0.0	96.49%	1671	<a href="#">LC650023.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus Miyazaki_Mz2_2009 genes for RNA-dependent RNA polymerase, movement pr...	Kyuri green mottl...	800	800	100%	0.0	96.49%	1662	<a href="#">LC650022.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus Miyazaki_Miyazaki-1_2008 genes for RNA-dependent RNA polymerase, move...	Kyuri green mottl...	756	756	100%	0.0	94.83%	1636	<a href="#">LC649927.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus Kagoshima_Higashikushira_2007 genes for RNA-dependent RNA polymerase, ...	Kyuri green mottl...	745	745	100%	0.0	94.42%	2255	<a href="#">LC649930.1</a>
Kyuri green mottle mosaic virus Saga_Ureshino_2007 genes for RNA-dependent RNA polymerase, movement...	Kyuri green mottl...	734	734	100%	0.0	94.01%	1637	<a href="#">LC649925.1</a>

圖 5. 將 RT-PCR 產物進行序列定序後在 NCBI 比對結果確認為 KGMMV