

不同因子對桃蚜媒介之矮南瓜黃化嵌紋病毒協助成分之影響

姚國山 盧耀村

台中市 國立中興大學植物病理學研究所

接受日期：中華民國 81 年 7 月 10 日

摘 要

姚國山、盧耀村。1992。不同因子對桃蚜媒介之矮南瓜黃化嵌紋病毒協助成分之影響。植病會刊 1:62-69。

矮南瓜黃化嵌紋病毒危害世界各地之葫蘆科作物且造成經濟上嚴重的損失。蚜蟲媒介矮南瓜黃化嵌紋病毒需有由病毒轉譯之協助成分(helper component; HC)的存在才能媒介成功。本文探討不同酸鹼值之緩衝液或溶液種類、離子濃度、還原劑或鉗合劑添加物、濃縮方式和在不同溫度下之保存時間對協助成分活性的影響。分別利用不同酸鹼值之醋酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸緩衝液、磷酸氫二鉀溶液、Tris-HCl緩衝液、Tris-H₂SO₄緩衝液、硼酸緩衝液和碳酸鈉緩衝液等研磨病葉，在 100,000 g 離心 90 分鐘後，所得含協助成分之上澄液添加等體積濃度為 0.2 mg/ml 之純化病毒，再經由桃蚜以人工膜餵食方式測試其傳毒能力，結果顯示其活性在 pH 值為 7、8 和 9 時之緩衝液內較佳，其中以在 pH 9 之磷酸氫二鉀溶液時的活性為最高，可達 77% 之傳播率。比較協助成分在磷酸氫二鉀溶液不同離子濃度中之活性，結果顯示其活性在離子濃度為 0.3 M 時較佳。經添加 0.1% 之亞硫酸鈉或二巰基乙二醇(2-mercaptoethanol)還原劑以及 0.01 M 之 EDTA、EGTA 和 DIECA 等鉗合劑至 0.3 M 之 K₂HPO₄ 溶液中，對協助成分之活性並無顯著提高。將含協助成分之上澄液置於室溫(24-28 C)、4 C 和 -20 C 下，結果發現置於室溫下處理之協助成分的活性，從對照組(0 小時)之 77%，經 24 小時後急降為 13%，48 小時後只餘 3%，而置於 4 C 者經 48 小時後仍有 17% 之活性存在，然而經 96 小時後除了置於 -20 C 之試液仍有 30% 之活性存在外，其它處理皆已失去活性。利用飽和硫酸銨溶液和聚乙二醇 6,000 (PEG MW 6,000) 溶液分級沉降含協助成分之試液，以及冷凍乾燥法和聚乙二醇 20,000 (PEG MW 20,000) 粉末濃縮處理含協助成分之試液，得知協助成分之活性可以在 30%-50% 之硫酸銨溶液或 4%-8% 之 PEG 6,000 溶液中沉降，而經冷凍乾燥及 PEG 20,000 粉末包埋濃縮處理之協助成分其活性分別為 60% 和 63%，其中以含 8% PEG 6,000 沉降之協助成分活性 77% 為較佳。

關鍵字：矮南瓜黃化嵌紋病毒、桃蚜、協助成分、媒介傳播。

緒 言

矮南瓜黃化嵌紋病毒(zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)屬於 potyvirus 群病毒的一員，1973 年首先在義大利北部，被 Lisa 等人(22)發現，從此世界各地陸續發現它的存在，並引起葫蘆科作物嚴重病害，造成經濟上相當大的損失(23,24,25,28,29)。1984 年許氏等(3)初步鑑定本省種植之胡瓜有 ZYMV 的危害，隨後許氏等(5)、張氏等(6)和黃氏等(7)以酵素連結抗體法(ELISA)偵測本省胡瓜、絲瓜、冬瓜、南瓜、甜瓜和

西瓜等葫蘆科作物，所發生之病毒種類以 ZYMV 感染比率為最高，其中絲瓜之感染比率更高達 97%。

Potyvirus 群病毒的特性之一是能經由蚜蟲以非永續性(nonpersistent)方式傳播(27)。Govier 和 Kassanis 首先發現感染馬鈴薯病毒 Y (potato virus Y, PVY)之病葉，經 100,000 g 超高速離心完全去除病毒後之上澄液，利用人工膜餵食法(artificial membrane feeding)進行蚜蟲傳播試驗，發現其上澄液具有幫助純化後之 PVY 病毒傳播之能力，而單獨之純化後 PVY 病毒，蚜蟲反而無法傳播。而經同樣離心力離心處理之健全上澄液，

也無幫助純化後病毒傳播之能力。顯示此罹病葉的上澄液中含有一種病毒粒子以外的成分存在，才可幫助純化後之病毒傳播，他們稱這種成分為協助成分(helper component) (11,12)。Govier等(13)和Hellman等(14)更進一步證實協助成分乃是一種病毒轉譯之蛋白質。Oh和Carrington(26)以及Carrington等人(9)利用site-directed mutagenesis方法得知協助成分蛋白是一種蛋白裂解(proteinase)。

Lecoq與Pitrat (19)報告指出ZYMV之協助成分和西瓜嵌紋病毒2(watermelon mosaic virus 2, WMV 2)之協助成分具高度之親和性，但是與西瓜嵌紋病毒1(watermelon mosaic virus 1, WMV 1)協助成分之親和性則較低，然而WMV 1與WMV 2之協助成分亦具有高度之親和性，此種現象即是ZYMV容易受蚜蟲傳播之原因。Lecoq(20)和Lecoq等(21)則發現ZYMV也有較不易受蚜蟲媒介及不被蚜蟲媒介之分離株(isolate)存在。梁氏(2)利用人工膜餵食方法，探討ZYMV和WMV 1之協助成分在流行病學上所扮演之角色，結果指出二種病毒之間具有專一性，不易相互協助傳播，同時其協助成分媒介原病毒之活性皆低於30%。

雖然已有許多有關potyvirus群病毒協助成分特性之報告，但是對於協助成分如何參與蚜蟲非永續性媒介potyvirus群病毒之詳細機制仍是未知(19,30)。因此本試驗主要目的，是在測試各種不同酸鹼值之緩衝液或溶液種類、離子濃度、還原劑或鉗合劑添加物、濃縮方式、以及不同溫度對協助成分活性之保存等因素，對蚜蟲媒介矮南瓜黃化嵌紋病毒能力的效益，俾供進一步研究蚜蟲非永續性媒介potyvirus群病毒機制的解明，因而進行本試驗。

材料與方法

材料來源及人工膜飼育取食

健全植物及蚜蟲準備：南瓜(*Cucurbit moschata* Duch.)種子係直接採自田間健全植株的果實，種子經7天育苗後篩選同一齡期的小苗供為試驗材料。供試健全桃蚜(*Myzus persicae* Sulz.)，係由菸試所方懷聖博士所提供。將桃蚜之成蟲移至台煙五號(*Nicotiana tabacum* cv. TT-5)，室溫下飼養，所得後代在原寄主煙草繁殖後，供為健全蚜蟲。

病毒來源：矮南瓜黃化嵌紋病毒(ZYMV)材料為本實驗室分離之冷凍保存材料(2,8)，以10倍量(w/v)之0.1 M磷酸緩衝液(pH 7.2)研磨，經紗布過濾，低速3,000 rpm離心5分鐘後，取上澄液機械接種至南瓜幼苗上大量增殖，供為試驗之材料。

人工膜(artificial membrane)製備：本試驗所使用

之人工膜飼育方法，係參照Sako氏等(31)、梁氏(2)和姚氏等(1)之方法。即以直徑2公分，高2.5公分的玻璃環，為了避光外圍貼黑色膠布，玻璃環一端為拉緊之石臘膜(parafilm membrane)，另一端則以細目網罩住限制蚜蟲之行動。傳毒試驗時，將400 μ l含有10%蔗糖之混合試液置於一端之石臘膜上，其上再用另一層石臘膜覆蓋，以防試液之蒸發，以利蚜蟲取食。

病毒之純化及濃度測定

參考Lecoq和Pitrat (19)、Huang等(17,18)、許氏等(4)、楊氏(8)、和梁氏(2)等純化ZYMV之方法。取接種第10天之病葉20 g，以5倍量(w/v)之0.3 M磷酸鉀緩衝液，pH 8.5，內含0.2%乙二胺四醋酸二鈉(disodium ethylene diamine tetraacetate, EDTA)，0.1%二巯基乙硫醇(2-mercaptoethanol)，首先以果汁機均勻磨碎，經紗布過濾後，濾液再加入20% (v/v)三氟三氯乙烷(1.1.2-trifluoro-1.2.2-trichloroethane)攪拌5分鐘，再以5,000 g離心10分鐘。取其上澄液加入2% Triton X-100，攪拌10分鐘，經11,000 g離心20分鐘，收集上澄液經63,000 g離心60分鐘，收集沉澱物以1 ml之0.02 M磷酸鉀緩衝液(pH 8.5)懸浮，再低速3000 rpm離心5分鐘，去除變性沉澱物。將所得之上澄液，再以凝膠過濾法(gel filtration)做進一步純化。即將上澄液流經已事先以0.02 M磷酸鉀緩衝液(pH 8.5)平衡的Sephacryl CL-4B凝膠之管柱(60 \times 0.9 cm)，並以同樣緩衝液洗出，流速每滴6秒，在波長254 nm的紫外光鑑視器(LKB4700 UVCORD)及記錄器(LKB Biocal)鑑視與記錄，每管收集30滴(約1 ml)，收集至透光度100%為止。依照記錄器顯示的曲線，分別收集具吸收峰之試液，利用陰染法以2%醋酸鈾(Uranic acetate)染色，在電子顯微鏡下觀察病毒存在之吸收峰位置，同時並分別接種至南瓜幼苗，由感染率測知ZYMV存在之吸收峰。本試驗純化病毒之收量依Beer's Lambert law公式換算其濃度，以ZYMV病毒1 mg/ml濃度時在260 nm之吸收係數(extinction coefficient) $E_{260\text{ nm}}^{0.1\%} = 2.5$ 代入其公式中(19)換算而得。由所測得之濃度再以原緩衝液稀釋至最終濃度至0.2 mg/ml，供為蚜蟲傳毒試驗之濃度。

協助成分粗汁液之製備

緩衝液或溶液之酸鹼值對協助成分活性之影響：參考Govier和Kassanis (11,12)、Sako和Ogata (32)、以及梁氏(2)分離協助成分之方法，取上述罹病葉片各10 g，分別加入3倍量(v/w)不同酸鹼值之緩衝液，包括醋酸鈉緩衝液pH 4與5、檸檬酸鈉緩衝液pH 4, 5與6、磷酸緩衝液pH 6, 7與8、磷酸氫二鉀溶液pH 9、Tris-H₂SO₄緩衝液pH 6, 7, 8與9、Tris-HCl緩衝液pH 6,

7、8與9、硼酸緩衝液 pH 8與9、碳酸鈉緩衝液 pH 9與10等八種不同緩衝液，以果汁機均勻磨碎，靜置10分鐘，經紗布過濾，所得濾液以8,000 g離心15分鐘，收集上澄液，再經100,000 g離心90分鐘，將病毒完全沉降去除後，再分別收集含協助成分之上澄液各1 ml，供為蚜蟲人工膜餵食試驗之試液。

K_2HPO_4 溶液之離子濃度對協助成分活性之影響：由上述試驗，選擇對協助成分活性最高之磷酸氫二鉀溶液 pH 9為協助成分之萃取溶液，將其離子濃度分0.02 M、0.1 M、0.3 M及0.5 M等四種不同濃度分別研磨病葉，經上述協助成分製備步驟，取最後的上澄液供為桃蚜傳播試驗，以測定不同離子濃度對協助成分活性的影響。

添加物對協助成分活性之影響：欲瞭解還原劑和鉗合劑加入0.3 M磷酸氫二鉀溶液 pH 9中對ZYMV協助成分活性之影響，分別使萃取液含有0.1%亞硫酸鈉(Na_2SO_3)，0.1%二巯基乙硫醇(2-mercaptoethanol)，0.01 M disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA)，0.01 M sodiumdiethyl dithiocarbamate (DIECA)，和0.01 M ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA)等添加物，依協助成分之製作步驟，取上澄液供桃蚜傳毒試驗。

不同濃縮處理方式對協助成分活性之影響：為要瞭解協助成分之濃度與其活性之間的關係，因此選用活性最高之0.3 M磷酸氫二鉀溶液 pH 9為萃取協助成分的溶液，將離心後含有協助成分的最後上澄液，再依下列四種不同處理方式進行濃縮，以供協助成分之活性測定。1.飽和硫酸銨溶液分級沉降法，即以事先準備之飽和硫酸銨溶液加入上述試液中，利用分級沉降之方法，分別使其含有20%、30%、40%、50%和60% (v/v)之硫酸銨溶液，在4 C下攪拌1小時後，經11,000 g離心20分鐘，沉澱物以原緩衝液分別懸浮濃縮成10倍試液，再經低速3000 rpm離心5分鐘去除沉澱，上澄液即為濃縮10倍之試液，再以原緩衝液在4 C下透析過夜後，供蚜蟲吸食以測試其協助成分之活性。2.聚乙二醇6,000 (polyethylene glycol MW 6,000; PEG 6,000)溶液分級沉降法，即取40% (w/v) PEG溶液加入上述最後上澄液中，使其先後分別含有聚乙二醇為4%、6%、8%及10% (w/v)四種不同濃度。在4 C下攪拌1小時後，經11,000 g離心20分鐘將蛋白沉降，取沉澱物以原緩衝液懸浮，濃縮成10倍，再經3000 rpm離心5分鐘去除不溶物，所得上澄液即為濃縮10倍之試液，同樣方法在4 C下透析過夜後，供蚜蟲吸食以測試其協助成分之活性。3.冷凍乾燥法，即取上述上澄液10 ml裝於冷凍乾燥瓶中，置於冷凍乾燥機(LABCONCO)內，真空冷凍6小時後以1 ml無菌水懸浮，即可得濃縮10倍之試液，再經同樣方法在4 C下

透析過夜後，供蚜蟲吸食以測試其協助成分之活性。

4.聚乙二醇20,000 (polyethylene glycol MW 20,000; PEG 20,000)粉末包埋濃縮法，取上述上澄液10 ml裝於透析膜內，再將其包埋於PEG 20,000粉末中，置於4 C下經2小時後剩1 ml之濃縮試液，以3,000 rpm離心5分鐘去除沉澱物，所得上澄液即為濃縮10倍之試液，同樣方法在4 C下透析過夜後，供蚜蟲吸食以測試其協助成分之活性。

儲藏溫度對協助成分活性之影響：為了要瞭解協助成分在何種溫度與時間下最能保持其最佳活性，經0.3 M磷酸氫二鉀溶液 pH 9所製備之上澄液，分別置於室溫(24–28 C)、4 C和-20 C下保存，並經0 (CK)、6、12、24、48、72和96小時後，再以上述同樣方法經蚜蟲取食以測其協助成分之活性。

蚜蟲獲毒取食及傳毒步驟

分別取上述製備含協助成分之試液，加入等量之當天純化之病毒，並使之含有10%蔗糖，均勻混合後，取400 μ l混合試液置於人工膜上，將事先飢餓處理3小時之蚜蟲移至玻璃環內，置於解剖顯微鏡下觀察，待蚜蟲停止移動，口針開始取食時，始計測其取食時間，以計時器測其取食時間。收集獲毒取食90秒鐘的蚜蟲，每五隻為一單位，接種至30株南瓜幼苗上，共三重複，並加以蟲罩，接種取食一天後，以殺蟲劑殺死蚜蟲，將接種後植株移置溫室，連續觀察2–3週，由感染率探討協助成份之活性。

結 果

病毒純化與濃度之測定

利用凝膠過濾法純化所得之病毒粒子，經由電子顯微鏡觀察與機械接種至寄主南瓜觀察發病情形，得知其存在第一吸收峰，而第二及第三吸收峰則無發現病毒粒子。將第一吸收峰試液經光譜儀在波長260 nm下測其吸收值，依Beer's Lambert Law公式換算其病毒濃度約為0.51 mg/ml，而後再將其稀釋至0.2 mg/ml濃度和含協助成分之試液等量混合，供為桃蚜測試協助成分活性之試驗。

緩衝液或溶液之酸鹼值對協助成分活性之影響

經桃蚜以人工膜餵食方式，測試不同pH值之緩衝液對協助成分活性之影響，結果如表一。即矮南瓜黃化嵌紋病毒之協助成分在磷酸氫二鉀 pH 9溶液中，其活性在三次重複測試30株幼苗中，有23株發病，發病率高達77%，較其它酸鹼值之各種緩衝液為高。因此，選用磷酸氫二鉀 pH 9溶液為本試驗之萃取溶液。

表一、緩衝液種類及其酸鹼值對桃蚜媒介之矮南瓜黃化嵌紋病毒協助成分活性之影響

TABLE 1. The effects of pH values of various buffers or solution on the activity of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) helper component in mediating the transmission of purified ZYMV by *Myzus persicae*¹

Buffer or solution	pH	Transmission			Average (%)
		I	II	III	
Acetate buffer	4	0/10	0/10	0/10 ²	0 h ³
Citrate buffer		0/10	0/10	0/10	0 h
Acetate buffer	5	0/10	0/10	0/10	0 h
Citrate buffer		0/10	0/10	1/10	3 gh
Citrate buffer	6	0/10	1/10	0/10	3 gh
Tris-HCl buffer		1/10	2/10	0/10	10 gh
Tris-H ₂ SO ₄ buffer		3/10	1/10	0/10	13 gh
Phosphate buffer		2/10	1/10	2/10	17 fgh
Tris-HCl buffer	7	2/10	2/10	2/10	20 fgh
Tris-H ₂ SO ₄ buffer		3/10	4/10	4/10	37 d
Phosphate buffer		4/10	5/10	4/10	43 cd
Tris-HCl buffer	8	3/10	3/10	4/10	33 de
Tris-H ₂ SO ₄ buffer		5/10	7/10	5/10	57 bc
Phosphate buffer		6/10	9/10	6/10	70 ab
Borate buffer		1/10	1/10	2/10	13 gh
Tris-HCl buffer	9	3/10	3/10	3/10	30 def
Tris-H ₂ SO ₄ buffer		6/10	4/10	7/10	57 bc
Borate buffer		1/10	0/10	1/10	7 gh
Carbonate buffer		0/10	2/10	1/10	10 gh
K ₂ HPO ₄ solution		9/10	7/10	7/10	77 a
Carbonate buffer	10	2/10	0/10	0/10	7 gh

1. A series of 0.1 M extraction buffers or solution were used to homogenize the pumpkin leaf tissues 10 days after inoculation with ZYMV. The activity of ZYMV helper component in the supernatant after centrifugation at 100,000 g for 90 min was examined by aphid transmission test. Each aphid was given a 90 second acquisition access to the feeding solution through parafilm membrane. The feeding solution contained 10% sucrose and an equal volume of undiluted supernatant and purified ZYMV (0.2 mg/ml). Five aphids were placed 24 hr on each test plant for inoculation.
2. Number of plants infected/number of plants tested; transmission of ZYMV was not observed in those treatments with supernatants prepared from healthy tissues with various buffers or solution tested.
3. Values followed by the same letter were not significantly different at $P = 0.05$, according to Duncan's multiple range test.

K₂HPO₄ 之離子濃度對協助成分活性之影響

由於磷酸氫二鉀溶液 pH 9 能保持矮南瓜黃化嵌紋病毒之協助成分較高之活性，爲了進一步瞭解不同離子濃度對其協助成分活性的影響，分別利用 0.02 M、0.1 M、0.3 M 及 0.5 M 之磷酸氫二鉀溶液 pH 9 製備試液，經方法所述離心後，以同樣方法餵食蚜蟲，測其協助成分之活性。結果如表二所示，即桃蚜媒介矮南瓜黃化嵌紋病毒之能力，以在 0.3 M 鹽類濃度時之 73% 爲最佳，而在 0.1 M 時爲 60% 則次之。

添加物對協助成分活性之影響

欲瞭解還原劑和鉗合劑對協助成分之影響，分別將 0.1% 亞硫酸鈉，0.1% 二羧基乙硫醇，0.01 M EDTA，0.01 M EGTA 和 0.01 M DIECA 添加物加入 0.3 M K₂HPO₄ 溶液中，經上述製備步驟，取上澄液以桃蚜測其協助成分之活性，結果如表三，即 0.1% 之亞硫酸鈉和 0.1% 之二羧基乙硫醇二種還原劑，以及 0.01 M 之 EDTA，DGTA 和 DIECA 三種鉗合劑，並不影響協助成分之活性，因其桃蚜傳播率與未添加任何還原劑或鉗合劑之對照組的桃蚜傳播率相比較，並無顯著差異。

表二、磷酸氫二鉀溶液之離子濃度對桃蚜媒介矮南瓜黃化嵌紋病毒協助成分活性之影響

TABLE 2. The effects of various concentrations of K₂HPO₄ solution on the activity of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) helper component in mediating the transmission of purified ZYMV by *Myzus persicae*¹

Concentration (M)	Transmission			Average (%)
	I	II	III	
0.02	5/10	5/10	6/10 ²	57 ab ³
0.1	6/10	5/10	7/10	60 ab
0.3	9/10	6/10	7/10	73 a
0.5	4/10	6/10	4/10	47 b

1. Aphids were fed as described in table 1. The supernatants were prepared with various concentrations of K₂HPO₄ solutions. Transmission of ZYMV was not observed in those treatments that feeding solutions contained only 10% sucrose and equal volume of every undiluted supernatant prepared with various concentration of K₂HPO₄ solution tested.
2. Number of plants infected/number of plants tested.
3. Values followed by the same letter were not significantly different at $P = 0.05$, according to Duncan's multiple range test.

表三、添加物對桃蚜媒介之矮南瓜黃化嵌紋病毒協助成分活性之影響

TABLE 3. The effects of various additives in 0.3 M K_2HPO_4 solution on the activity of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) helper component in mediating the transmission of purified ZYMV by *Myzus persicae*¹

Additive	Transmission			Average (%)
	I	II	III	
0.3 M K_2HPO_4	7/10	8/10	8/10 ²	77 a ³
0.1% Sodium sulphite	8/10	8/10	7/10	77 a
0.1% Mercaptoethanol	7/10	6/10	7/10	67 a
0.01 M EDTA	8/10	7/10	8/10	77 a
0.01 M EGTA	7/10	8/10	7/10	73 a
0.01 M DIECA	6/10	7/10	7/10	67 a

1. Transmission tests were performed as described in table 1.
2. Number of plants infected/number of plants tested.
3. Values followed by the same letter were not significantly different at $P = 0.05$, according to Duncan's multiple range test.

不同濃縮處理方式對協助成分活性之影響

為要瞭解協助成分之濃度與其活性之間的關係，因此利用不同濃度之飽和硫酸銨和聚乙二醇溶液分級沉降以及物理因子的冷凍乾燥法濃縮含有協助成分之上澄試液，其結果如表四所示。即協助成分之蛋白能在含有 30-50% 之硫酸銨溶液中沉降，而在聚乙二醇溶液中，則在含有 4%-8% 之濃度中沉降，另外以冷凍乾燥機及 PEG 20,000 粉末包埋濃縮處理之傳毒率則分別為 60%、63%，其中以 8% PEG 6,000 沉降之協助成分活性 77% 較佳。

儲藏溫度對協助成分活性之影響

選用抽出協助成分效果最佳之以 0.3 M 磷酸氫二鉀溶液 (pH 9) 製備粗汁液，經上述方法離心後，所得含有協助成分的上澄液，分別將試液置於室溫 (24-28 C)、4 C 及 -20 C 下保存，經 0、6、12、24、48、72、96 小時後，不同時間利用蚜蟲測其對協助成分之媒介病毒之活性。結果如表五所示，即在室溫下經過 24 小時，協助成分的活性，由原來之 77% 降至 13%；經 96 小時後則活性完全消失。在 4 C 下保存時，經 24 小時後尚有 43% 活性，但經過三天其活性也消失；在 -20 C 下經 48 小時，則有 53% 之活性，至第三天仍有 30% 活性存在。

表四、分級沉降與濃縮處理方式對桃蚜媒介之矮南瓜黃化嵌紋病毒協助成分活性之影響

TABLE 4. The effects of various concentration treatments on the activity of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) helper component in mediating the transmission of purified ZYMV by *Myzus persicae*¹

Treatment	Transmission			Average (%)
	I	II	III	
Supernatant (CK)	7/10	6/10	8/10 ²	70 ab ³
$(NH_4)_2SO_4$ 30 (%)	6/10	3/10	3/10	37 c
	40	7/10	7/10	70 ab
	50	8/10	7/10	70 ab
	60	0/10	0/10	0 d
PEG 6,000 4 (%)	4/10	5/10	4/10	43 c
	6	5/10	7/10	60 b
	8	7/10	7/10	77 a
	10	0/10	0/10	0 d
Lyophilization	5/10	5/10	8/10	60 b
PEG 20,000 powder	7/10	6/10	6/10	63 ab

1. Aphid feeding was performed as described in table 1.
2. Number of plants infected/number of plants tested.
3. Values followed by the same letter were not significantly different at $P = 0.05$, according to Duncan's multiple range test.

討 論

根據 Sako 氏等 (31) 和梁氏 (2) 報告指出，在純化瓜類病毒時，就純化病毒之乾淨度而言，所利用之緩衝液以磷酸鉀緩衝液較磷酸鈉緩衝液為乾淨，對病毒之收量而言，則微鹼性域酸鹼值較微酸性域為高。因此，本試驗純化 ZYMV 病毒所使用之緩衝液為 0.3 M 磷酸鉀 (pH 8.5)，以此緩衝液純化所得 ZYMV 病毒，供為桃蚜測試協助成分活性之試驗。

由本試驗所使用萃取協助成分之緩衝液或溶液所得結果 (表一)，顯示緩衝液或溶液之酸鹼值，能影響 ZYMV 協助成分之活性，即在 pH 4 和 pH 5 之醋酸鈉緩衝液和 pH 4 之檸檬酸鈉緩衝液中，協助成分並無活性存在，而在 pH 7 之磷酸緩衝液其傳播率較同 pH 值之 Tris-HCl 和 Tris- H_2SO_4 緩衝液為高，然而在 pH 8 中，磷酸緩衝液亦較其它種緩衝液能保持其協助成分之活性，並且以在 pH 9 中之磷酸氫二鉀溶液所保持的 ZYMV 協助成分之活性為最高，也就是 ZYMV 協助成分之活性在 pH 6-10 範圍內，同時由本試驗結果顯示，

表五、保存溫度對桃蚜媒介之矮南瓜黃化嵌紋病毒協助成分活性之影響

TABLE 5. The effects of storage temperatures and durations on the activity of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) helper component in mediating the transmission of purified ZYMV by *Myzus persicae*¹

Temperature of storage (C)	Duration of storage (hr)	Transmission			Average (%)
		I	II	III	
Room temperature (24-28)	0	7/10	10/10	6/10 ²	77 a ³
	6	7/10	4/10	6/10	57 b
	12	4/10	5/10	2/10	37 bcd
	24	1/10	1/10	2/10	13 ef
	48	0/10	0/10	1/10	3 f
	96	0/10	0/10	0/10	0 f
4	6	9/10	7/10	7/10	77 a
	24	3/10	5/10	5/10	43 bc
	48	1/10	1/10	3/10	17 def
	96	0/10	0/10	0/10	0 f
-20	48	5/10	5/10	6/10	53 b
	72	5/10	4/10	3/10	40 bc
	96	2/10	4/10	3/10	30 cde

1. Aphid feeding was performed as described in table 1.

2. Number of plants infected/number of plants tested.

3. Values followed by the same letter were not significantly different at $P = 0.05$, according to Duncan's multiple range test.

緩衝液種類的選擇對 ZYMV 協助成分之活性的影響較其緩衝液之酸鹼值明顯。此結果與 Raccah 和 Pirone (30) 所報告煙草蝕刻病毒 (tobacco etch virus, TEV) 之協助成分的活性存在於 pH 值 5-10 間類同。

在不同離子濃度下之協助成分活性，以在 0.1 M-0.3 M 之磷酸氫二鉀溶液中之活性為較佳，其原因乃是由於磷酸氫二鉀溶液在此離子濃度時，寄主成分或是抑制成分容易和協助成分分離而沉降，因而獲得協助成分純度較高之上澄液，使得蚜蟲媒介病毒能力提升，因為離子濃度在 0.1 M-0.3 M 時經超高速 (100,000 g) 離心後所得之上澄液，所呈現的顏色較在 0.02 M 之離子濃度時為淡，而比 0.5 M 之離子濃度時為深，雖然以 0.5 M 之離子濃度所得試液的顏色為最淺，但其活性卻最低，可能係因 ZYMV 之協助成分在 0.5 M 之高離子濃度溶液中，以及 100,000 g 的超高速離心下也發生沉降，因而造成協助成分在上澄液中之濃度太低所致。

添加 0.1% 之亞硫酸鈉與二羧基乙硫醇還原劑以及 0.01 M 之 EDTA、EGTA 和 DIECA 鉗合劑等添加物，對協助成分之活性並無顯著提高，此結果與 Espinoza 等 (9) 報告亞硫酸鈉與二羧基乙硫醇還原劑並不能提高花椰菜嵌紋病毒 (cauliflower mosaic virus, CaMV) 協助

因子之活性相同，但與 Govier 及 Kassanis (10) 報告 PVY 在添加 EDTA 及 DIECA 後會增加其協助成分之活性的情形相異。

利用硫酸銨、PEG 6,000、冷凍乾燥法和 PEG 20,000 粉末等四種不同方式，沉降濃縮協助成分的處理試驗中，得知協助成分之蛋白容易在含有 4%-8% PEG 6,000 或 30%-50% 硫酸銨溶液中沉降，其中以 8% 之 PEG 6,000 沉降之協助成分活性 77% 為較佳，而經 PEG 20,000 粉末與冷凍乾燥法濃縮之協助成分其活性並無顯著提高，其原因認為是在含協助成分之上澄液中經上述二種不同沉降方式濃縮 10 倍後，其協助成分之含量雖然增多，但是相對的寄主植物其它成分或是抑制成分的濃度亦可能相對的增加，而使協助成分之活性無法顯著的提升所致。

協助成分在耐保存性之試驗中，其活性在低溫 4 C 下能維持 48 小時以上，而在 -20 C 下，則至少可以維持 96 小時以上，此結果與 Govier 氏等 (11) 所報告馬鈴薯 Y 病毒之協助成分活性在 4 C 下可以維持二天相類似。

綜合以上試驗結果所得而知，ZYMV 之協助成分在 pH 值 6-10 範圍內皆有活性存在，其中以在中性域或鹼性域之磷酸鉀緩衝液或溶液中活性較佳，尤以 0.3

M之磷酸氫二鉀溶液較能保持其協助成分之活性，而緩衝溶液之離子濃度則在0.1 M-0.3 M間其協助成分之活性較佳，但是還原劑或鉗合劑等之添加物，並無顯著提高ZYMV協助成分之活性。將含協助成分之上澄液經四種不同沉降濃縮方式處理，得知協助成分蛋白容易在含4%-8%之PEG 6,000以及含30%-50%之硫酸銨溶液中沉降，而以8% PEG 6,000所沉降之協助成分活性較佳。另外，將含協助成分之上澄液經低溫處理較其在室溫下能保持其活性之存在。

謝 辭

本試驗所使用之健康桃蚜，承蒙菸試所方懷聖博士慨贈，文成後蒙曾國欽教授斧正，謹此一併誌謝。本文是第一作者博士論文的一部份。

引用文獻

1. 姚國山、盧耀村. 1990. 矮南瓜黃化嵌紋病毒協助成分之純化及其活性測定. 植保會刊 32:334 (摘要)。
2. 梁幟龍. 1988. 矮南瓜黃化嵌紋病毒與矮西瓜嵌紋病毒協助成分之研究. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 50 pp。
3. 許秀惠、王惠亮、黃秋雄. 1984. 矮南瓜黃化嵌紋病毒之初步鑑定. 植保會刊 26:442 (摘要)。
4. 許秀惠、王惠亮、黃秋雄. 1985. 矮南瓜黃化嵌紋病毒之分離與鑑定. 中華農業研究 34:87-95。
5. 許秀惠、黃秋雄、張清安、楊偉正、張有明、蕭吉雄. 1987. 五種瓜類病毒在本省六種葫蘆科作物上之發生與分佈. 植保會刊 29:233-244。
6. 張有明、蕭吉雄、楊偉正、許秀惠、趙玉珍、黃秋雄. 1987. 五種瓜類病毒在本省甜瓜及西瓜之發生與分布. 中華農業研究 36:389-397。
7. 黃秋雄、趙玉珍、張清安、許秀惠、蕭吉雄. 1987. 本省絲瓜病毒種類之鑑定及其病徵比較. 中華農業研究 36:413-420。
8. 楊佐琦. 1986. 造成胡瓜脈綠嵌紋病徵之病原鑑定. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 55 pp。
9. Carrington, J. C., Freed, D. D., and Sanders, T. C. 1989. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. J. Virol. 63:4459-4463.
10. Espinoza, A. M., Markham, P. G., Maule, A. J., and Hull, R. 1988. In vitro biological activity associated with the aphid transmission factor of cauliflower mosaic virus. J. Gen. Virol. 69:1819-1830.
11. Govier, D., and Kassanis, B. 1974. Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y. Virology 57:285-286.
12. Govier, D., and Kassanis, B. 1974. A virus-induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. Virology 61:420-426.
13. Govier, D., Kassanis, B., and Pirone, T. P. 1977. Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. Virology 78:306-314.
14. Hellman, G., Thornbury, D., Hiebert, E., Shaw, J., Pirone, T. P., and Rhoads, R. 1983. Cell-free translation of tobacco vein mottling virus RNA. II. Immunoprecipitation of products to antisera to cylindrical inclusion, nuclear inclusion and helper component proteins. Virology 124:434-444.
15. Hiebert, E., Thornbury, D. W., and Pirone, T. P. 1984. Immuno-Precipitation analysis of potyviral in vitro translation products using antisera to helper component of tobacco vein mottling virus and potato virus Y. Virology 135:1-9.
16. Huang, C. H., Hseu, S. H., and Chao, Y. J. 1986. Purification and serology of an isolate of zucchini yellow mosaic virus. J. Agr. Res. China 35:495-503.
17. Huang, C. H., and Hseu, S. H. 1989. Purification, serology and properties of five zucchini yellow mosaic virus isolates. Plant Pathology 38:414-420.
18. Lecoq, H., and Pitrat, M. 1985. Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. Phytopathology 75: 890-893.
19. Lecoq, H. 1986. A poorly aphid transmissible variant of zucchini yellow mosaic virus. Phytopathology 76:1063. (Abstr.)
20. Lecoq, H., Bourdin, D., Raccah, B., Hiebert, E., and Purcifull, D. E. 1991. Characterization of a zucchini yellow mosaic virus isolate with a deficient helper component. Phytopathology 81:1087-1091.
21. Lisa, V., Boccardo, G., D'Agostino, G., Dellavalle, G., and d'Agulio, M. 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. Phytopathology 71:667-672.
22. Lisa, V., and Lecoq, H. 1984. Zucchini yellow mosaic virus. No. 282 in: Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England. 4 pp.
23. Nameth, S. T., Laemmlen, F. F., and Dodds, J. A. 1985.

- Viruses cause heavy melon losses in desert valleys. California Agriculture July-August 28-29.
25. Nameth, S. T., Dodds, J. A., Paulus, A. O., and Kishaba, A. 1985. Zucchini yellow mosaic virus associated with severe diseases of melon and watermelon in southern California desert valleys. Plant Dis. 69:785-788.
 26. Oh, C. E., and Carrington, J. C. 1989. Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-pro by site-directed mutagenesis. Virology 173:692-699.
 27. Pirone, T. P., and Harris, K. F. 1977. Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids. Annu. Rev. Phytopathol. 15:55-73.
 28. Providenti, R., Gonsalves, D., and Humaydan, H. S. 1984. Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. Plant Dis. 68:443-446.
 29. Purcifull, D. E., Adlerz, W. C., Simone, G. W., Hiebert, E., and Christie, S. R. 1984. Serological relationship and partial characterization of zucchini yellow mosaic virus isolated from squash in Florida. Plant Dis. 68:230-233.
 30. Raccach, B., and Pirone, T. P. 1984. Characteristics of and factors affecting helper-component-mediated aphid transmission of a potyvirus. Phytopathology 74:305-308.
 31. Sako, N., Matsuo, K., and Fukuji, N. 1980. Purification of watermelon mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 46:639-646.
 32. Sako, N., and Ogata, K. 1981. Different helper factors associated with aphid transmission of some potyviruses. Virology 112:762-765.

ABSTRACT

Yao, K. S., and Lu, Y. T. 1992. Influence of various factors on the helper-component-mediated aphid transmission of zucchini yellow mosaic virus. Plant Pathol. Bull. 1:62-69. (Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is a member of potyviruses and causes severe losses of cucurbit crops throughout the world. Transmission of potyviruses in nature is almost accomplished by aphid. However, aphid transmission of ZYMV depends on the presence of a virus-encoded protein termed as helper component (HC). This study was to determine the effects of pH values of various buffers or K_2HPO_4 solution, K_2HPO_4 concentrations, additives of antioxidants and chelating agents, concentration methods, and storage temperature on the activity of ZYMV HC in mediating the transmission of purified ZYMV by *Myzus persicae*. A series of 0.1 M extraction buffers or K_2HPO_4 solution at pH values ranging from 4 to 10 were used to homogenize the ZYMV infected squash leaf tissues. The activity of ZYMV HC in the supernatant after a 100,000 g, 90 min, centrifugation was examined by feeding the aphids on the tested solution through a parafilm membrane. The tested solution contained 10% sucrose and an equal volume of undiluted supernatant and purified ZYMV (0.2 mg/ml). The results showed that the activity of ZYMV HC was higher in neutral or alkaline extraction buffers or K_2HPO_4 solution than in acid buffers. Among them, K_2HPO_4 solution, pH 9, resulted in the highest aphid transmission rate, 77%. The activity of ZYMV HC in K_2HPO_4 solution was higher in the concentration of 0.3 M than in other concentrations tested. Addition of 0.1% two antioxidants, sodium sulphite and 2-mercaptoethanol, and 0.01 M of three chelators, EDTA, EGTA and DIECA to 0.3 M K_2HPO_4 did not increase the activity of ZYMV HC. The activity of ZYMV HC in the supernatant rapidly decreased from 77% (transmission rate) to 13% and 3% after kept at room temperature for 24 hr and 48 hr, respectively; those at 4 C for 48 hr were 17%; no activity of ZYMV HC was detected after kept at room temperature or 4 C for 96 hr. However, ZYMV HC activity remained 30% transmission rate after storage at -20 C for 96 hr. Most of ZYMV HC activity in the supernatant was precipitated by 30%-50% saturated ammonium sulfate or by 4%-8% PEG 6,000. The rates of transmission of the HC in the supernatant after lyophilization and embedding with PEG 20,000 were 60% and 63%, respectively. Precipitation with 8% PEG 6,000 was the best concentration method, which resulted in the highest rate of aphid transmission (77%).

Key words: zucchini yellow mosaic virus, *Myzus persicae*, helper component, transmission.