

水稻萎凋矮化病毒之理化性質¹

陳慶忠 王雲鶴²

摘 要

水稻萎凋矮化病病毒之生體外理化性，以媒介褐飛蝨(*Nilaparvata lugens*)蟲體注射法予以測定。五倍量之檸檬酸緩衝液(0.2 M, pH 6.2)，磷酸緩衝液(0.1~0.2 M, pH 7.2)，Tris-HCl緩衝液(0.2 M, pH 7.5)及硼酸緩衝液(0.2 M, pH 8.0)抽取病葉粗汁液，病毒均能維持相當活性。有機溶媒四氯化碳，氯仿處理粗汁液後，具較佳之淨化效果，且病毒在粗汁液中仍能維持其活性。病毒在0.1 M磷酸緩衝液pH 5~9之病葉抽出液中均具有活性。在4℃時罹病葉片抽出液耐保存性達6日以上；室溫(26~33℃)時僅可維持1日。在罹病葉片抽出液中耐稀釋性為 10^{-5} ~ 10^{-6} ，而帶毒蟲者為 10^{-6} ~ 10^{-7} 。本病毒之耐熱性為40~50℃。罹病水稻粗汁液經三日三次凍結(-20℃)及解凍，病毒仍具活性。

前 言

水稻萎凋矮化病(rice wilted stunt)於1977年第二期作在臺中地區首次發現，經證實由褐飛蝨(*Nilaparvata lugens* stål)以持續性方式(Persistent type)傳播^(2,4)。本病病徵隨接種水稻品種、季節等不同而異。以臺南五號苗期接種為例，罹病株明顯矮化，下方葉片呈銹褐色斑駁，新展開葉片呈淡綠色，後期出現之分蘖常扭曲。低溫季節罹病株分蘖數較健全者減少，夏季則略增加。在田間，第二期作早期感染之稻株常於水稻生育初中期夭折。未死亡之病株不能抽穗。

Pellergrini與Bassi⁽⁷⁾報告草狀矮化病(grassy stunt)之罹病組織細胞核或細胞質內有束狀或纖維狀之細胞內含體(inclusion body)。類似之細胞內含物在萎凋矮化病亦曾被觀察到⁽⁵⁾。Chen與Chiu⁽⁴⁾根據本病病徵，昆蟲傳播特性及細胞內含體等特性認為萎凋矮化病可能為草狀矮化病之一種較嚴重之病徵型(Symptomatologic type)。晚近菲律賓國際稻米研究所亦發現由褐飛蝨傳播之不明病害⁽¹³⁾。據其病徵及昆蟲傳播描述，極似本省之萎凋矮化病。此外，Hibino與Cabauatan⁽⁶⁾報告國際稻米研究所發現之不明病害與草狀矮化病有血清類緣關係。

本研究係利用昆蟲注射法對稻萎凋矮化病病毒在生體外之性質加以測定。所得結果，報告如後。

材料及方法

供試植物及病毒：

供試植物均為臺南五號水稻(*Oryza sativa* L.)。發病株葉片或獲毒後15日以上之帶毒媒介昆蟲，置於研鉢中以磷酸緩衝液(0.1 M, pH 7.2)磨碎，汁液經紗布過濾；低速(3,000 rpm)離心10分鐘，抽取上澄液供注射用之病毒材料。

¹ 臺中區農業改良場研究報告第 0051 號。

² 分別為臺中區農業改良場副研究員及約僱助理。

注射方法：

第2~3齡之未帶毒若蟲，經CO₂處理使之昏迷後，用毛筆將之排置於注射板上，使蟲體腹部朝上。另外小橡皮管一端連接毛細玻管；一端含於口中，吸取病毒汁液，在放大鏡下將毛細管尖端刺入倒數第3或第4腹節間，吹入微量之病毒汁液於蟲體中。本試驗注射昆蟲之病毒粗汁液並未定量。注射後之昆蟲置於試管中，管內放有3~5株稻苗，經24小時後，將甦醒並飼食於苗上之褐飛蝨群飼於健全稻苗上。經10日之潛伏期，計算存活蟲數，再一蟲一苗方法接種，每隔2日更換稻苗一次，連續三次。接種後之稻苗種植於網室，記錄發病情形。

結 果

緩衝液對水稻粗汁液中病毒之影響

罹病水稻葉剪碎後，分別加入5倍量之檸檬酸緩衝液(citrate)(0.2 M, pH 6.2)、硼酸緩衝液(boric acid-borax)(0.2 M pH 8.0)、tris-HCl緩衝液(0.2 M, pH 7.5)及0.1 M或0.2 M磷酸緩衝液(phosphate)(0.1 M或0.2 M, pH 7.2)，研磨並過濾，經低速離心，取上澄液注射於未帶毒褐飛蝨，以測定感染力。結果如表一。四種供試緩衝液中以磷酸緩衝液研磨出之粗汁液感染力最高。硼酸緩衝液中之病葉粗汁液注射於昆蟲10日後活存數最少，感染力亦最低。

表一、罹病水稻粗汁液中緩衝液與酸鹼度對病毒之影響

Table 1. Effect of buffer and pH value on the infectivity of RWSV in the crude rice sap

Buffer	Insects injected	0.1M phosphate pH 7.2	0.2M phosphate pH 7.2	0.2M citrate pH 6.2	0.2M Boric acid-borax pH 8.0		0.2M tris-HCl pH 7.5
	80	13/25	11/23	7/22	3/15		7/19
pH value (0.1M phosphate)	Insects injected	5	6	6.5	7	8	9
	60	1/5	11/24	5/18	9/23	2/11	2/7

Denominator represent the number of injected insects that survived over 10 days, and numerator represents the number of insects which became viruliferous.

酸鹼度對病毒之影響

罹病水稻葉片剪碎分別加入5倍量不同酸鹼度(pH為5, 6, 6.5, 7, 8, 9)之磷酸緩衝液(0.1 M)置於研鉢中磨碎、過濾，經低速離心，分別取上澄液接種於未帶毒若蟲。結果(表一)顯示在pH 5.0~9.0之範圍中，粗汁液均具感染力。但pH 5, 8及9處理之汁液，注射後昆蟲感染力偏低。

罹病水稻粗汁液中有機溶媒對病毒之影響

罹病水稻葉剪碎後，分別加入5倍量之磷酸緩衝液(pH 7.2)研磨、過濾，經低速離心，取上澄液，靜置20分鐘再分別以正丁醇(n-butanol, 2%, 4%, 8%)，氯仿(chloroform, 5%, 10%, 20%)，四氯化碳(CCl₄, 10%, 20%, 40%)及freon (30%, 40%, 50%)等四種有機溶媒之不同濃度(v/v)攪拌5分鐘或將前述上澄液經celite過濾處理。前述有機溶媒處理之汁液經低速離心，得上澄液注射於不帶毒褐飛蝨，以測定各處理對病毒感染力之影響及淨化效果，結果如表二。不同處理中celite過濾者淨化效果最佳，氯仿及四氯化碳CCl₄次之，n-butanol又次之，freon最差。但注射後昆蟲之感染力則以freon處理者最高，氯仿、四氯化碳及正丁醇次之，celite處理幾無感染力。

表二、罹病水稻粗汁液中有機溶媒對病毒之影響

Table 2. Effect of organic solvents on the infectivity of RWSV in the crude rice leaf sap

Solvents and concentration (v/v)		Insects injected	Insects* inoculation feeding tested	No. of viruliferous insect	% of transmitter
freon	20%	40	19	11	57.9
	30%	40	20	11	55.0
	40%	40	19	5	26.3
chloroform	5%	40	14	2	14.3
	10%	40	23	15	65.2
	20%	40	14	5	35.7
CCl ₄	10%	40	13	5	38.5
	20%	40	4	1	25.0
	40%	40	11	1	9.1
n-butanol	2%	40	22	8	36.4
	4%	40	14	4	28.6
	8%	40	15	0	0
celite	—	40	26	0	0

*Insects survival over 10 days after injection.

罹病水稻粗汁液中病毒之耐稀釋度

罹病水稻葉片加9倍量磷酸緩衝液(0.1 M, pH 7.2)，在研鉢中磨碎，過濾所得汁液，經低速離心，取其上澄液，視為10倍稀釋液；再以磷酸緩衝液(0.1 M)依次稀釋成 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 等稀釋液，分別注射於未帶毒若蟲。結果如表三。由表中知此病毒在罹病水稻粗汁液中之耐稀釋性為 10^{-4} ~ 10^{-5} 。

保毒蟲汁液中病毒之耐稀釋度

選取潛伏期約已結束之帶毒褐飛蝨成蟲98隻，接種試驗獲知該蟲群帶毒蟲率為46%。98隻帶毒蟲加99倍量(w/v)之磷酸緩衝液(0.1 M, pH 7.2)，置於研鉢中磨碎、過濾，榨取汁液，經低速離心，其上澄液視為 10^{-2} 倍稀釋液。繼以上述緩衝液依次稀釋為 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 等。分別注射於未帶毒若蟲。試驗結果如表三。由表知帶毒蟲汁液之耐稀釋性為 10^{-6} ~ 10^{-7} 。本項結果並未考慮供試蟲群中54%未帶毒者。

罹病水稻粗汁液中病毒之耐熱性

罹病水稻葉剪碎後加10倍量磷酸緩衝液(0.1 M, pH 7.2)，置研鉢中磨碎、過濾，取其汁液，低速離心，將上澄液分裝於玻璃細管內(5×0.5 cm)，分別移置40, 50, 60, 70及80℃定溫水槽中處理10分鐘隨即移至冰水中冷卻之，將各液注射於未帶毒若蟲。結果如表三。由表中可知此病毒的耐熱性為50℃。

表三、不同處理對水稻萎凋矮化病毒安定性之影響

Table 3. Stability of RWSV after various treatments of crude rice leaf or insect sap

	Dilution	Insects injected	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Dilution end point	Leaf sap	50	5/26	2/14	7/26	1/11	0/31	0/17	0/25	—
	insect sap	80	—	6/17	6/27	8/24	11/28	12/35	0/23	0/19
Longevity in vitro	Days	Insects injected	0	1	2	3	4	5	6	
	Leaf sap (4°C)	40	7/12	6/11	3/5	3/9	3/13	5/10	7/16	
Freezing (-20°C) & thawing (26°C)	Days	Insects injected	1	2	3					
	Leaf sap	40	5/21	2/12	4/6					
Thermal inactivation	Temperatures (°C)	Insects injected	40	50	60	70	80			
	Leaf sap	50	5/17	3/19	0/16	0/13	0/10			

Denominator represents the number of injected insects that survived over 10 days, and number represents the number of insects which became viruliferous.

罹病水稻粗汁液中病毒耐保存日數

罹病水稻葉片剪碎加入5倍量之磷酸緩衝液(0.1 M, pH 7.2)，於研鉢中磨碎、過濾，濾液經低速離心，取上澄液分6管貯存於小試管中，保存於4°C。按日取出1管注射於未帶毒若蟲，至第6日止。結果如表三。試驗結果顯示病毒汁液在4°C時，保存至第6日，仍具感染力。

凍結融解對病毒的影響

罹病水稻葉片剪碎加入5倍量之磷酸緩衝液(0.1 M, pH 7.2)，於研鉢中磨碎、過濾，濾液經低速離心，取上澄液分成3管，凍結保存於-20°C之冷凍箱中。每日取出使其融解，並任取一管注射於未帶毒若蟲，連續3日。結果(表三)顯示3次重複凍結融解之粗汁液，仍具感染力。

討 論

稻萎凋矮心病罹病葉以磷酸緩衝液(0.1及0.2 M)，檸檬酸緩衝液(0.2 M)，硼酸緩衝液(0.2 M)，Tris-HCl緩衝液(0.2 M)抽取之粗汁液，注射於未帶毒褐飛蝨，注射蟲之成活率在19%至31%之間，這些存活蟲之感染率在20%至52%之間。如與褐飛蝨傳播之皺縮矮化病毒比較則注射後活蟲率(%)及感染力均較低⁽¹⁾。其感染力與媒介昆蟲自然獲毒者相近^(2,4)。

測定磷酸緩衝液(0.1 M)不同酸鹼度對病毒之影響時，當pH 6.0~7.0間，注射後昆蟲感染力比緩衝液偏酸或偏鹼高。氯仿，四氯化碳對水稻粗汁液之淨化效果較佳，且昆蟲注射後感染率較為穩定。粗汁液經過celite濾後所獲淨化效果亦良好。濾液注射昆蟲後均不引起感染，此可能因過濾時病毒被吸附所致。病毒粗汁液在4°C時耐保存日數在6日以上，但在室溫(26~33°C)下，粗汁液翌日即變成混濁，經注射之蟲體均告死亡。粗汁液耐稀釋度在 10^{-4} ~ 10^{-5} 間，而帶毒蟲汁液耐稀釋度在 10^{-6} ~ 10^{-7} 間。此外自帶毒蟲磨出液注射昆蟲後感染力較植物抽取之粗汁液為高。將來從事病原純化工作選用帶毒蟲為材料似為一可循之途徑。

參考文獻

1. 周廷光、仙北俊弘、四方英四郎 1979 水稻皺縮矮化病之體外安定性 植保會刊 21:226-232。
2. 陳慶忠、柯文華、邱人璋 1978 褐飛蝨傳播之水稻萎凋矮化病 植保會刊 20:376 (摘要)。
3. Cabauatan, P. Q. and H. Hibino. 1983. Unknown disease of rice transmitted by the brown planthopper in Philippines. IRRN 8(2):12.
4. Chen, C. C. and R, J. Chiu. 1982. Three symptomatologic types of rice virus diseases related to grassy stunt in Taiwan. Plant Disease 66:15-18.
5. Chen, M. J., N. J. Ko, C. C. Chen and R, J. Chiu. 1979. Cell inclusions associated with wilted stunt disease of rice plants. Plant Prot. Bull. (Taiwan) 21:368-371.
6. Hibino, H. and P. Q. Cabauatan. 1983. Serological relations between rice grassy stunt and unknown disease of rice transmitted by *Nilaparvata lugens* (Stal) in the Philippines. IRRN 8(2):12.
7. Pellegrini, S. and M. Bassi. 1978. Ultrastructure alterations in rice plant affected by grassy stunt disease. Phytopathol. Z. 92:247-250.
8. Shikata, E., T. T. Senboku and T. Ismizu. 1980. The causal agent of rice grassy stunt disease. Proc. Jpn. Acad. 56 Ser. B 2:89-94.

Some Physical and Chemical Properties of Rice Wilted Stunt Virus¹

C. C. Chang and U. H. Wang²

ABSTRACT

A virus-like disease of rice was collected from the central part of Taiwan during the second crop season of 1977. The disease was characterized by extreme plant stunting and leaf wilting and was transmitted by rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål). It was tentatively named rice wilted stunt (RWS) (Plant Prot. Bull. Taiwan 20:376, 1978). Based on the symptoms, its transmission by the planthopper and cellular inclusions observed in the infected plants, it was also considered as a symptomatologic type of rice grassy stunt (Plant Disease 66:15-18, 1982).

The stability of RWSV was determined by injecting the crude rice leaf extract into healthy planthoppers. The virus was stable in citrate (0.2M, pH6.2), phosphate (0.1 or 0.2M, pH7.2), tris-HCl (0.2M, pH7.5) and boric acid-borax (0.2M, pH8.0) buffers. Organic solvents such as CCl₄ and chloroform had a clarification effect and the infectivity of the RWSV in crude extract sap remained after treatments. The virus retained its infectivity in crude leaf extracts of phosphate buffer (0.1M) at pH between 5 and 9. The in vitro longevity of the virus in rice sap was 6 days at 4 °C and only one day at room temperature (26-33 °C). The dilution end point was between 10⁻⁴~10⁻⁵ in crude plant sap and in insect extracts was 10⁻⁶~10⁻⁷. The thermal inactivation point in rice leaf extracts was 50 °C for 10 minutes. The infectivity of the virus was not reduced by three cycles of freezing-thawing of diseases leaf extracts.

¹Contribution No. 0051 of Taichung DAIS.

²Associate Entomologist and Research Assistant of Taichung DAIS, respectively.