

水稻縞葉枯病毒之純化及部份性質研究¹

陳慶忠 黃婉玲²

摘 要

利用高低速交互離心及蔗糖梯度離心純化之縞葉枯病毒(rice stripe virus, RSV)，A260/280比值為 1.409 ± 0.13 ，平均每公克水稻病葉可純化 $27.8 \mu\text{g}$ 病毒。純化材料之準備以4月至6月接種發病者純化病毒濃度較高。純化病毒經SDS裂解後以12.5%膠體電泳分析得到分子量34.7 K 鞘蛋白一種。前述純化病毒再經一次硫酸銨等密度離心所得病毒材料以2%醋酸雙氧鈾溶液染色，可觀察到寬度約10 nm，長度不一，最長為 $40 \mu\text{m}$ 呈線形或環形之螺旋體構造的病毒顆粒。利用western blotting方法以RSV抗血清與RSV及玉米條紋病毒(maize stripe virus, MStV)抗原作用時有免疫反應產生，但與水稻萎凋矮化病毒(rice wilted stunt virus, RWSV)則無。ELISA以RSV抗血清與RSV抗原有專一性反應，但與MStV及RWSV均呈微弱免疫反應。

關鍵字：水稻縞葉枯病毒、純化、電子顯微鏡、核蛋白、血清類緣關係。

前 言

水稻縞葉枯病(rice stripe disease)最早是在1890年代於日本關中地區群馬、櫛木縣發生⁽³⁾。謝、邱氏在本省於1969年首次記錄⁽⁶⁾，隨後15年除1971~1973年全省一、二期作累計發生面積達千餘公頃外，其餘年次僅見在中部及高屏水稻栽培區局部發生，未引起廣泛重視。1984年第一期作本病發生面積驟增，並迅速蔓延至全省，嚴重發生之稻田幾至廢耕狀態，一般罹病稻產量損失亦達40~50%。根據農林廳1984~1987統計資料全省每年一、二期稻累計發生面積分別為7,663、18,744、5,917及4,284 ha。1988年以後發生程度又戲劇性地減少到原先局部發生之水準⁽⁴⁾。

水稻縞葉枯病由tenuivirus引起，此類病毒具有以下特性：(1)核蛋白為螺旋體構造呈線狀或絲狀，具一種鞘蛋白，分子量約35 Kd和4或5種分子量不同之單股核糖核酸(single strand ribonucleic acid)，(2)罹病株含大量非鞘蛋白(noncapsid protein)，(3)寄主局限於單子葉禾本科植物，(4)病毒經由飛蝨類(delphacid planthoppers)以持續繁殖性方式(persistent-propagative manner)傳播^(14,15,25)。在日本水稻縞葉枯病毒(rice stripe virus, RSV)主要由斑飛蝨(*Laodelphax striatellus* (Fallen))媒介傳播，*Unkanodes sapporonas* Matsumura，*U. albifascia* M.及*Terthron albiovittatus* M.亦經試驗證明能傳播本病毒^(2,3)。在本省縞葉枯病毒僅知由斑飛蝨媒介傳播^(6,19)。本文就台灣發生之縞葉枯病毒的純化、電子顯微鏡及血清學等部份性質之研究結果提出報告，以供參考。

¹ 臺中區農業改良場研究報告第 0306 號。

² 臺中區農業改良場研究員兼作物環境課課長、約僱助理。

材料及方法

病株準備

水稻縞葉枯病病株於1987年原始採集自彰化縣二水鄉，在本場網室(夏季)或玻璃室(冬季)內經常以室內飼養之斑飛蝨(*Laodelphax striatellus*)吸食病株後經潛伏期再接種台南5號(後期改用台農67號)稻苗保存病株源。一般採集發病後10~14日的病株冰凍貯存(-20°C)，供為純化之材料。

病毒純化

縞葉枯病毒(rice stripe virus, RSV)純化操作均於4°C冷房內進行。取冰凍罹病水稻葉片剪碎加入3倍量0.25M磷酸鉀緩衝液pH 7.5(內含0.01 M EDTA, 0.1% Na₂SO₄)以攪肉機(waring blender)充分攪碎並靜置30分鐘，紗布過濾後，濾液緩緩加入四氯化碳(CCl₄)至最後濃度為20%。上述濾液以12,000 g離心10 min.，取上層液加入1% (V/V) Triton X-100充分攪拌10分鐘後經12,000 g離心10分鐘，取上層液並以9.5 ml之20%蔗糖溶液墊底，於81,400 g離心90 min.後之沈澱物以0.025 M磷酸鉀緩衝液pH 7.5懸浮之，並置於5~30%蔗糖梯度上，於155,600 g離心3.5 hr，抽取病毒沉降帶並於72,400 g離心120分鐘沈降，沈降物以0.01 M磷酸緩衝液懸浮，供為病原性、鞘蛋白或血清學分析使用。進一步純化係將前述經由蔗糖梯度離心所得之部份純化樣品置於53% (W/W)硫酸銨(Cs₂SO₄)等密度梯度於62,300 g離心20 hr，抽取病毒沉降帶後於72,400 g離心90 min.，沈降物再以0.01 M磷酸鈉緩衝液或無菌水懸浮即得純化病毒，供為抗血清製作或電子顯微鏡觀察之材料。

電子顯微鏡觀察

取純化病毒一滴於石蜡膜上加入等量0.1% bacitracin均勻混合後，將銅網(grid)置於經固定之混液上浮附約1 min.，以濾紙吸去銅網上殘存混液並以1~2滴無菌水滌洗，隨即以2~3滴2%醋酸雙氧鈾(Uranyl acetate, UA)染液滴洗染色，染色後以濾紙吸乾銅網上的染液，再於電子顯微鏡(JEOL 200 CX)觀察。

病原性測定

前述部份純化病毒樣品以毛細管(口徑0.15~0.18 mm)經由酒精燈微火加熱二道所拉成之細針注射先經二氧化碳(CO₂)麻醉之3~4齡斑飛蝨若蟲胸足基部，每隻蟲注射量約0.2μl，於注射後10日起以單隻蟲每日接種健康稻苗至蟲體死亡止。經接種之稻苗移植於網室觀察發病情形以確認供試蟲之傳病情形。

病毒鞘蛋白分子量之測定

蛋白質分析時同時取純化水稻縞葉枯病毒、萎凋矮化病毒(純化方法見文獻9)及玉米條紋病毒(純化方法見文獻10)等病毒材料加入Degrading buffer (2% SDS, 10% Ficoll, 0.06 M Tris-HCl pH 8.8, 0.002 M EDTA及0.01% Bromophenol blue)於65°C煮10 min.後進行膠體電泳分析(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)，以Pharmacia (LMW) Calibration Kit標示蛋白質分子量，總共試驗五次，取其平均值決定鞘蛋白分子量。

抗血清製備及力價測定

純化病毒樣品以等量輔佐劑(complete adjuvant)混合完全乳化後，注射白兔後腿肌肉，一週後純化抗原改以imcomplete adjuvant混合乳化，每週注射一次，共計注射四次，每次注射白兔劑量約0.5 mg/ml。最後一次注射7天後開始自耳朵靜脈部份採血抽取抗血清。利用免疫擴散反應(SDS-immunodiffusion)測定抗血清對同源(homologous)及異源(heterologous)抗原之反應力價。

免疫酵素聯結分析(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

罹病或健全水稻葉片材料以3倍量coating buffer (phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, 內含0.05% Tween-20)沿磨，萃取粗汁液或病毒純化樣品(A₂₆₀=0.5) 10倍系列稀釋，做為抗原。供試抗血清為自備以純化病毒注射白兔免疫所得多元抗體(polyclonal antibody)。試驗使用之抗體係先經以健康水稻汁液吸附(preabsorbing)亦即取1 g健康水稻加4 ml conjugated buffer研磨；取1 ml前述處理之粗汁液加入等量RSV抗血清反應10 min.後備用。夾層免疫抗體分析(double antibody sandwich ELISA, DAS ELISA)採用Clark and Adams之方法⁽¹²⁾。試驗IgG稀釋濃度為1μg/ml, IgG-alkaline phosphatase conjugate Sigma稀釋倍數為1,000倍。Indirect ELISA則根據Voller *et al.*⁽²⁶⁾及Koening⁽²²⁾之方法。血清微量盤孔穴加入以coating buffer萃取病葉之粗汁液或稀釋之純化病毒抗原(A₂₆₀=0.5) 200μl。清洗後加入以PBS-Tween緩衝液IgG (1μg/ml)置於37°C恆溫箱內3 hr，清洗後加入以conjugated buffer (PBST內含2% polyvinylpyrrolidone-40)稀釋8,000倍之goat-anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)，於37°C放置3 hr或4°C過夜，清洗後加入溶於diethanolamine buffer之酵素基質並以ELISA測讀儀(Bio- Tek Instruments, Burlington, VT)測讀A₄₀₅之吸收值。媒介昆蟲ELISA分析時，單隻供試斑飛蝨以抽出緩衝液(extracting buffer) 200μl研磨，其餘步驟同前述罹病植物之測定。前述罹病粗汁液或媒介昆蟲A₄₀₅讀值若超過對照組(以健全植物汁液或未吸毒媒介昆蟲所做)平均值3倍以上，判定為正反應。

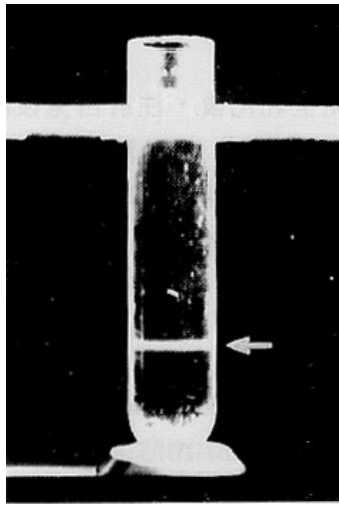
結 果

病毒之純化

利用硫酸銨等密度平衡離心法離心20 hr後抽取距離離心管(7.5 cm×1.5 cm)底3.4~3.5 cm的病毒帶(圖一)，經沈降懸浮所得純化病毒在紫外光譜儀220~320 nm測讀吸收光譜，最高及最低吸收值分別為261 nm及236 nm(圖二)。取10次純化結果估算260 nm與280 nm吸收比值(A₂₆₀/280)為1.409±0.13。根據Gingery *et al.*之方法⁽¹³⁾，估算每公克接種發病葉片純化病毒收量為7.2μg~53.8μg，10次純化之平均病毒收量為27.8μg。將不同月份純化所得結果加予比較，以4~5月發病之病株材料純化獲得病毒濃度較高，夏秋季準備之病株材料純化所得病毒收量較低。

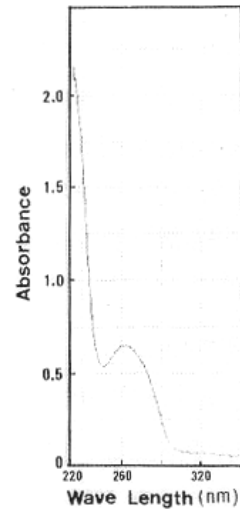
電子顯微鏡觀察

經由硫酸銨等密度離心所純化之RSV病毒樣品，以2%醋酸雙氧銨(UA)染色，在電子顯微鏡下可觀察到核蛋白呈螺旋狀構造(helix structure)，寬度約10 nm。外形為彎曲線狀或絲狀，呈不定形環狀或分枝狀(圖三)。



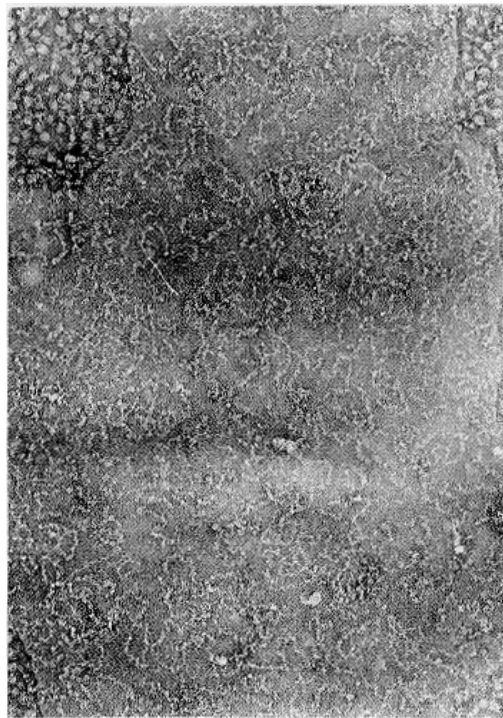
圖一、水稻縞葉枯病毒硫酸銫等密度離心後形成之核蛋白沉降帶。

Fig. 1. Purified rice stripe virus obtained after isopycnic centrifugation in 53% (W/W) cesium sulfate gradient at 62,310 g in a Hitachi RPR 65 T rotor for 20 hr. A single opaque band formed at 2.7 cm from the bottom of the centrifuge tube (arrow).



圖二、水稻縞葉枯病毒之紫外光吸收光譜。

Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of purified rice stripe virus.



圖三、水稻縞葉枯病毒純化核蛋白電顯圖。

Fig. 3. Electron micrographs of purified preparation of RSV. Samples were recovered from cesium sulfate isopycnic centrifugation at 62,310 g for 20 hr and negatively stained with 2% Uranyl acetate without fixation.

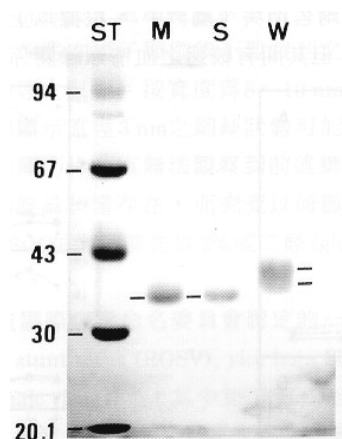
病原性測定

總數120隻3~4齡斑飛蝨若蟲經CO₂麻醉後以毛細管微針注射經蔗糖梯度離心之部份純化病毒樣品每隻蟲約注射2μl，10日後存活蟲個別以單株稻苗(台農67號)餵食接種，每日換

苗一次至供試蟲死亡止。接種後稻苗移植網室內觀察發病情形。供試蟲中74隻活存超過10日，其中17隻能傳播病毒。同一試驗60隻接種無菌水之對照蟲，活存超過10日者49隻，均無傳毒現象。證明經上述步驟純化之病毒仍保有病原性。

病毒鞘蛋白分子量分析

純化之病毒裂解後經12.5% SDS-PAGE於200 V泳動約6小時後以0.01% Coomassie Brilliant Blue R染色並以0.5%醋酸溶液褪色分析之結果發現本病毒外鞘乃由一蛋白小單位所構成，取六次試驗估算之平均分子量為34.7 K(圖四)。



圖四、SDS-polyacrylamide gel 電泳分析水稻縞葉枯病毒鞘蛋白分子量。

Fig. 4. SDS-polyacrylamide (12.5%) gel showing purified capsid of rice stripe virus (lane S), rice wilted stunt virus (lane W) and maize stripe virus (lane W). Molecular weight markers are shown at left (lane ST). About 10 μ l (A260=1) of samples was placed in each well and electrophoresed at 1 v/cm for 6 hr.

血清反應

本試驗製備之抗血清經以免疫擴散反應測定其與同源抗原(純化病毒濃度調整為A260=0.5)之反應力價為1/64，而與對照健康水稻粗汁液則無沉澱反應產生。

一、ELISA鑑定罹病植物

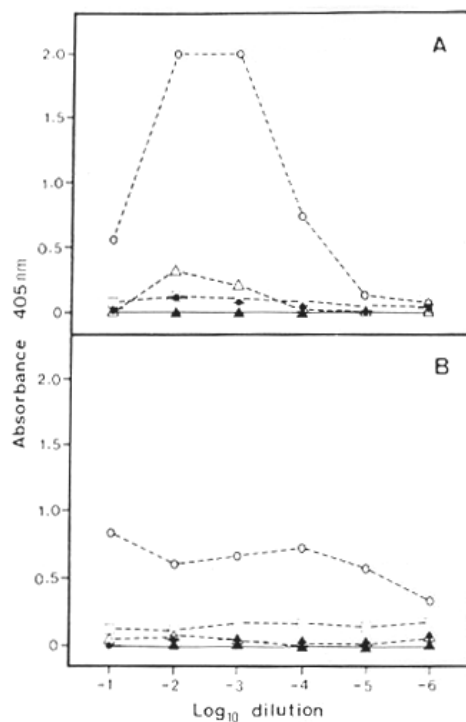
利用自備之RSV抗血清，以DAS ELISA分析RSV罹病水稻葉片粗汁液並以健康水稻葉片粗汁液做為對照。粗汁液經10倍系列稀釋進行免疫反應分析，經呈色反應結果罹病粗汁液有效反應稀釋倍數為 10^{-4} 。以Indirect ELISA方法分析時，其有效反應稀釋倍數則為 10^{-7} (圖四)。

二、ELISA鑑定帶毒媒介昆蟲

利用DAS ELISA測試96隻吸食病株二週後之斑飛蝨成蟲，於ELISA分析前一日先行生物檢定亦即以個別蟲體接種單株稻苗測定其帶毒情形。供試96隻斑飛蝨中計有7隻傳播病毒，這些傳病蟲經ELISA分析呈色反應10分鐘，A405讀值平均1.270 (1.024~1.660)；另89隻接種時未傳病，這些蟲體在ELISA分析時A405讀值為對照組(36隻供試蟲)，A405讀值平均0.0165 (0~0.089) 3倍以上並判定為正反應者計有13隻，其中5隻A405讀值平均為0.816 (0.648~0.946)，另8隻A405讀值平均為0.1315 (0.083~0.204)。ELISA分析判定為負反應者計有76隻，其A405讀值平均為0.0199 (0~0.079)。

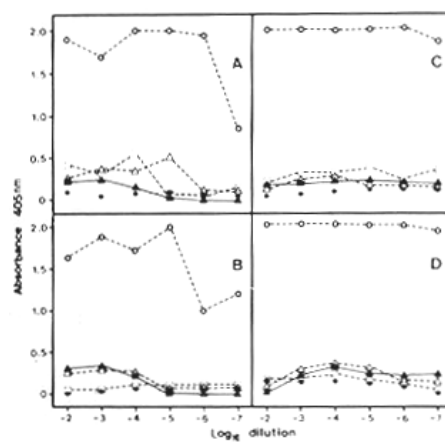
三、RSV與其他tenuiviruses之血清類緣關係

RSV與水稻萎凋矮化病毒(rice wilted stunt virus, RWSV)及玉米條紋病毒(maize stripe virus, MStV)為台灣禾本科作物中所發現之三種屬於tenuiviruses之病毒。以RSV抗血清與RSV, RWSV及MStV抗原行Western blotting分析, RSV抗血清與同源抗原產生專一性反應, 但與異源抗原RWSV及MStV則無。但在Indirect ELISA分析, RSV抗血清除與同源抗原產生專一性反應外, 與RWSV及MStV等異源抗原亦產生微弱正反應(圖五)。在Indirect ELISA分析時, 當異源抗原RWSV及MStV分別以各自抗血清先行吸收處理(preabsorbing)時, 則其與RSV抗血清產生之免疫反應均告消失(圖六)。根據以上試驗結果, 推定RSV、RWSV與MStV三種病毒為不同病毒, 但其間有較遠之血清類緣關係。



圖五、間接法酵素聯結抗體免疫分析比較水稻縞葉枯病毒(RSV), 萎凋矮化病毒(RWSV)及玉米條紋病毒(MStV)之抗原特異性。

Fig. 5. Absorbance (A405) values for indirect ELISA tests using the purified virus preparation (A) and crude sap of infected plants (B) of RSV (○----○), RWSV(□----□) and MStV (△----△) adjusted to an initial concentration of A₂₈₀=0.5 reacting with antiserum to RSV. ●——● and ▲——▲ represent extracts from healthy plants of rice and maize, respectively.



圖六、間接法酵素聯結抗體免疫分析比較水稻縞葉枯病毒(RSV), 萎凋矮化病毒(RWSV)及玉米條紋病毒(MStV)之血清類緣關係。

Fig. 6. Absorbance (A405) values for indirect ELISA tests. Sap of plants infected with rice stripe virus (RSV)(○----○), rice wilted stunt virus (RWSV) (□----□) and maize stripe virus (MStV) (△----△) reacting with RSV antiserum. ●——● and ▲——▲ represent extracts from healthy plants of rice and maize, respectively.

A: RSV antiserum preabsorbed by crude sap of healthy rice plants.

B: RSV antiserum preabsorbed by crude sap of RWSV infected plants.

C: RSV antiserum preabsorbed by crude sap of healthy rice plants.

D: RSV antiserum preabsorbed by crude sap of MStV infected plants.

討 論

水稻縞葉枯病早期認為是由一種直徑約30 nm之球形病毒所引起⁽¹⁾。1975年小金等陰染罹病葉片於電子顯微鏡下觀察到一種呈分枝狀絲狀體, 長度400 nm, 寬度約8 nm。當利用

蔗糖梯度離心及D₂O蔗糖等密度離心後在電子顯微鏡下檢視，亦可觀察到分枝狀絲狀體，寬度3 nm，呈環形或捲曲狀⁽¹⁾。Hibino *et al.*在比較草狀矮化病毒(rice grassy stunt virus, RGSV)與RSV之形態特性時，指出RSV核蛋白為螺旋體構造，直徑11~13 nm，絲(線)狀(thread-like filament)外形多呈環形，螺旋體構造鬆弛後呈細絲狀^(18,20)。Ishikawa *et al.* (1989)利用蔗糖梯度離心，分別得到M1, M2, B及NB等4個成份之沉降帶，經電顯分別檢視病毒核蛋白皆呈環形絲狀，不同沉降帶含有不同長度之核蛋白，M1成份(component)含510 nm; M2成份含610 nm; B成份含840 nm; NB成份含2110 nm⁽²⁰⁾。利用電泳方法計可分離到4種分子量不同之核酸，分別為 1.9×10^6 , 1.4×10^6 , 1×10^6 , 0.9×10^6 daltons^(23,24,25)。本試驗使用之純化方法經蔗糖梯度再經一次硫酸銨梯度離心僅得到一沉降帶，電顯檢視核蛋白呈螺旋狀(helix)構造，寬度約10 nm長度100~600 nm不等。不同之報告在電子顯微鏡下觀察到之核蛋白大小或長度之差異有可能受使用之純化藥品或染色方法等之影響。按寬度為8~10 nm呈螺旋狀構造之絲(或線)狀體可能為核蛋白，本試驗電顯圖顯示直徑3 nm之細絲狀體可能是螺旋狀構造鬆弛的結果(陳未發表資料)。由於罹病組織超薄切片一直無法觀察到前述螺旋絲狀體構造，推測tenuivirus在罹病細胞組織內可能並非以螺旋絲狀體存在，而究竟以何種狀態存在可能有賴進一步觀察。比較試驗尚觀察到RWSV, MStV在陰染前先以2%戊二醛(glutaraldehyde)固定可以減少病毒凝聚，但RSV則不需要固定步驟⁽⁸⁾。

Tenuiviruses是1987年始被國際病毒命名委員會認定的一群病毒⁽¹⁵⁾。國內外記錄之此類病毒計有RSV, MStV, rice grassy stunt virus (RGSV), rice hoja blanca virus, European wheat striate mosaic virus及winter wheat mosaic virus等⁽²⁵⁾。其中RSV, rice wilted stunt virus (RWSV)(RGSV的一種病徵型)⁽⁹⁾及MStV在本省有發生記載^(5,6,7,9)。這些病毒中RSV, MStV及RGSV間有部份血清類緣關係^(8,9,10,14,16,27)，但其媒介昆蟲種類不同，病毒核蛋白大小(直徑)也有差異。

利用DAS ELISA分析媒介昆蟲之帶毒個體在病害田間流行學研究上，就時、空需求而言，確有其必要性。惟媒介昆蟲ELISA分析結果與其實際傳播病毒間之關係如何，值得深入探討。就本試驗為例，在分析96隻供試蟲中，於吸食病株後第14日利用接種稻苗方式檢定傳病蟲，同批供試蟲於翌日以DAS ELISA分析，紫外光譜儀A405讀值平均1.270 (1.024~1.660)與對照組之0.0165 (0~0.089)呈明確之正反應。在89隻接種時未傳病蟲中，若以對照組讀值之3倍做為正反應判別依據，則正反應蟲體計有13隻，其中5隻之讀值較高平均為0.816 (0.648~0.946)，另8隻平均為0.132 (0.083~0.204)。這些供試蟲ELISA分析為正反應，而在吸毒後第14日未傳病之可能原因：(1)病毒在蟲體內之潛伏期尚未結束，(2)帶毒媒介昆蟲在每日傳播接種中，有隔日(數日)傳毒現象，(3)媒介昆蟲可能因個體因素，吸毒後帶毒而不傳毒。此外，由於以對照組紫外光譜儀A405吸收值之3倍以上判定為正反應是一種人為設定值，有可能經ELISA分析之蟲體並不傳病，而被判定為正反應，果如此則此種假設並不合理。以ELISA分析褐飛蝨(*Nilaparvata lugens*)傳播RGSV, RWSV或rice ragged stunt virus之帶毒蟲發現傳病蟲與ELISA反應亦不一致，亦即有非傳病蟲在ELISA分析呈正反應，少數傳病蟲在ELISA分析時有呈負反應者^(11,17,21)。因此筆者認為在利用ELISA分析帶毒蟲時，根據呈色反應利用肉眼來判定帶毒個體或較為簡易可行。

誌 謝

本研究承行政院農委會80農建－7.1－糧－37(5)及81農建－12.2－糧－10(3)計畫資助；柯文華先生、陳亭云小姐協助試驗工作，李淑珍小姐協助資料整理，謹此一併申謝。

參考文獻

1. 小金澤碩城 土居養二 與良清 1975 イネ縞葉枯イルスの純化 日植病報 1: 148~154。
2. 新海昭 1962 稻ウイルス病の蟲媒傳染に關する研究 農技研究所報告 C14: 1~112。
3. 新海昭 1985 イネ縞葉枯病をめぐる諸情勢と問題點 植物防疫 39: 503~507。
4. 臺灣省政府農林廳 1969~1992 臺灣省植物保護工作總報告。
5. 趙佳鴻 陳慶忠 江華瑋 王玉沙 1988 台灣玉米條紋毒素病之發生研究 台中區農業改良場研究彙報 26: 11~26。
6. 謝式垚鈺 邱人璋 1969 台灣水稻新毒素病-縞葉枯病(摘要) 植物保護會刊 11: 75。
7. 謝式垚鈺 邱人璋 1970 台灣水稻新病害-草狀矮化病 植保會刊 16: 162~166。
8. Chen, C. C. 1992. Comparative studies on three tenuiviruses occurring in Taiwan (Abst.) Symposium on "plant virus and virus-like disease" held at National Chung Hsing University, Taichung Dec. 23-24, 1992.
9. Chen, C. C., W. L. Huang, W. H. Ko and C. H. Chao. 1994. Purification, characterization and serological analysis of rice wilted stunt virus. Plant Patho. Bull. (Taiwan) (in press).
10. Chen, C. C., J. H. Tsai, R. J. Chiu and M. J. Chen. 1993. Purification, characterization and serological analysis of maize stripe virus in Taiwan. Plant Dis. 77: 367-372.
11. Chen, C. C. and R. J. Chiu. 1989. Transmission of rice wilted stunt virus by brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) Bull. Taichung Dis. Agri. Impro. Station 23: 3-10.
12. 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.
13. Gingery, R. E., L. R. Nault and O. E. Bradfute. 1981. Maize stripe virus: Characteristics of a member of a new virus class. Virology 112: 99.
14. Gingery, R. E., L. R. Nault and S. Yamashita. 1983. Relationship between maize stripe virus and rice stripe virus, J. Gen. Virol 64: 1765.
15. Gingery, R. E. 1988. The rice stripe virus group. p.279-329. in: The Filamentous Plant Viruses. R. G. Milne, ed. The plant viruses Vol. 4. Pleum Press.
16. Hibino, H. 1986. Rice grassy stunt virus-purification and serology. Tech. Bull. Trop. Agr. Res. Center. Japan 21: 34-40.
17. Hibino, H. and I. Kimura. 1982. Detection of rice ragged stunt virus in insect vectors by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Phytopathology 72: 656-659.

18. Hibino, H., T. Usugi, T. Omura, T. Tsuchizaki, K. Shohara and M. Iwasaki. 1985. Rice grassy stunt virus: A planthopper-borne circular filament. *Phytopathology* 75: 894-899.
19. Hsieh, C. Y. 1973. Transmission of rice stripe virus by *Laodelphax striatellus* Fallen in Taiwan, *Plant Prot. Bull.(Taiwan)* 15: 153.
20. Ishikawa, K., T. Omura and H. Hibino. 1989. Morphological characteristics of rice stripe virus. *J. Gen. Virology* 70: 3465-3468.
21. Iwasaki, M., M. Nakano and A. Shinkai. 1985. Detection of rice grassy stunt virus in planthopper vectors and rice plants by ELISA. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 51: 450-458.
22. Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55: 53-62.
23. Toriyama, S. 1982. Characterization of rice stripe virus: a heavy component carrying infectivity. *J. Gen. Virol.* 61: 187-195.
24. Toriyama, S. 1982. Three ribonucleic acids associated with rice stripe virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 48: 482-489.
25. Toriyama, S. 1983. Rice stripe virus, in: *Descriptions of Plant Viruses*, No.269. Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, U.K.
26. Voller, A., D. E. Bidwell and A. Bartlett. 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine, Theory and Practice. *Bull. W. H. O.* 53: 55-65.
27. Yamashita, S., Y. Doi and K. Yora. 1982. Comparative characteristics of rice stripe virus(RSV) and maize stripe virus(MStV). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 48: 131.

Purification, Partial Characterization and Serological Properties of Rice Stripe Virus¹

Ching-Chung Chen and Wan-Ling Huang²

ABSTRACT

Rice stripe virus (RSV) isolated in central Taiwan has been purified and partial characterized. RSV was purified from infected leaves of *Oryza sativa* L. by one cycle of differential centrifugation, followed by isopycnic centrifugation in cesium sulfate gradient. Preparation thus obtained has a maximum absorbance at 261 nm and a minimum at 236 nm. The A_{260/280} ratio of purified nucleoprotein was 1.409±0.13. The yield of purified RSV was 7.2 to 53µg with an average of 27.8µg per gram of rice leaf tissue. Purified RSV stained with uranyl acetate, appeared as a helical structure about 10 nm wide. The thread-like filaments about 100-600 nm either appeared as irregular circular form or flexible filaments. Sometimes, uncoiled filaments or filaments with branches were also observed. One species of capsid protein subunit with molecular weights estimated as 34.7 K was obtained in the purified preparation of RSV by SDS-PAGE procedure. In western blotting test, the antiserum produced against RSV reacted specifically with RSV but not with two other tenuiviruses, rice wilted stunt virus (RWSV) and maize stripe virus (MStV). However, positive heterologous reactions were obtained between RSV antiserum and antigens of RWSV and MStV in indirect ELISA test, although the readings of the heterologous reaction were relatively weak.

Key words: rice stripe virus, purification, electron microscopy, nucleoprotein, serological relationship.

¹ Contribution No. 0306 from Taichung DAIS.

² Head of Crop Environmental Division and Assistant of Taichung DAIS.