

矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 經瓜類種子傳播的特性及其檢測

鄧汀欽^{1,*} 蔡錦慧² 林羿廷² 周建銘³

摘要

鄧汀欽、蔡錦慧、林羿廷、周建銘。2017。矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 經瓜類種子傳播的特性及其檢測。台灣農業研究 66(3):230–239。

比較生物分析 (bioassay)、間接法酶聯抗體免疫分析 (indirect ELISA)、西方墨漬法 (western blot) 及反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 等檢定方法之靈敏度，據以研擬瓜類種子帶矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 的標準檢測流程，其中包括群體測試的採樣及統計分析、供試樣品製備、適合的檢驗方法及檢測結果的表示等。以出口種子檢測來測試標準檢測流程，其中 1 個南瓜種子批號有 ZYMV 檢出；以“Seedhealth”程式計算，病毒檢出率為 $0.47 \pm 0.46\%$ ，其中 ELISA 陽性反應的檢體經 RT-PCR 檢測，明確顯示 ZYMV 的存在，核酸解序其 RT-PCR 產物，進一步確定檢測結果；但以出芽試驗檢測同批種子，未能在子代苗株發現病株。檢測市售胡瓜種子，所有 9 個供試品種都呈陰性反應。ZYMV 接種胡瓜，部分抗病品種的果實與種子以 ELISA 檢驗均無 ZYMV 檢出，取感病品種的罹病株果實採樣，新鮮種子中可測得 26% 帶有 ZYMV，種子乾燥 15 d 後，全數供試種子均無 ZYMV 檢出。西瓜罹病株果實之果蒂、果底、果皮、外果肉、內果肉及果中柱均有 ZYMV 分佈，未成熟的種子則比成熟的種子帶有較多病毒，通常西瓜「甜美人」比「黑美人」的種子較容易測出 ZYMV。另置於 10°C 冰箱保存 1 yr 的「甜美人」西瓜種子，仍有 60% 可檢出 ZYMV，而出芽試驗所檢測的種子傳染率仍為 0。

關鍵詞：標準檢測流程、病毒檢測、胡瓜、西瓜、南瓜。

前言

矮南瓜黃化嵌紋病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) 在 1981 年於法國 (Lecoq *et al.* 1981) 與義大利 (Lisa *et al.* 1981) 同時被發現並命名，隨後在全球各地相繼被發現，1985 年台灣也發表 ZYMV 之分離與鑑定報告 (Hseu *et al.* 1985)。ZYMV 屬於 *Potyviridae* 科之 *Potyvirus* 屬，長絲狀病毒顆粒，田間接觸感染或靠蚜蟲以非永續性方式傳播，可感染多種葫蘆科作物，是 1980 年代胡瓜、絲瓜、苦瓜、冬瓜、南瓜、甜瓜及西瓜田間發生最普遍且最

嚴重的病毒，造成植株葉片黃化、嵌紋，全株矮化或萎凋、果實與種子變形，若幼株受感染則無法開花結果。當時認為 ZYMV 無經種子傳播的能力 (Lecoq *et al.* 1981; Nameth *et al.* 1985; Greber *et al.* 1987; Provvidenti & Robinson 1987; Gleason & Provvidenti 1990; Robinson *et al.* 1993; Wong *et al.* 1994)，但 10 年內世界五大洲各種瓜類作物幾乎都可發現被 ZYMV 感染的情形，其快速又廣泛的傳播特性，被懷疑有經種子媒介傳染的能力。1990 代的報告指出，南瓜種子帶有 18.9% 的 ZYMV (Davis & Mizuki 1986)，Greber *et*

投稿日期：2016 年 10 月 26 日；接受日期：2016 年 11 月 24 日。

* 通訊作者：tcde@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

al. (1988) 檢出 *Cucurbita pepo* L. 有 1% 的 ZYMV 種傳率, Al-Musa (1989) 證實 ZYMV 感染的 *Ranunculus sardous* Crantz 之種子所長出的實生苗有 1.3% 帶有 ZYMV。此外, Schrijnwerkers *et al.* (1991) 證實 *C. pepo* 罹病株新鮮果實中的種子半數以上可檢測出 ZYMV, 且病毒都存在於種皮外部; 或認為 ZYMV 僅是汙染種子外表 (Desbiez & Lecoq 1997), 但 ZYMV 可侵染至甜瓜果實中, 隨果實的運銷作長距離傳播亦被 Lecoq *et al.* (2003) 證實。經多年論證, ZYMV 可經種子傳播的現象才在本世紀被定調 (Fletcher *et al.* 2000; Riedle-Bauer *et al.* 2002; Tobias & Palkovics 2003; Muller *et al.* 2006; Coutts, *et al.* 2011; Simmons, *et al.* 2011; Lestari & Nurhayati 2014; Sevik & Balkaya 2015)。Simmons *et al.* (2011) 證實 ZYMV 在南瓜 (*C. pepo* sub. *texana*) 經種子傳染至種苗 (seed to seedling transmission) 的現象, 係因 ZYMV 已侵染至種胚 (embryonic infection)。上述文獻中確切的數據, 使 ZYMV 經種子傳染的現象無所遁形。因此, 近年來瓜類種子進出口有關 ZYMV 的檢疫備受關注。本文研究以台灣的瓜類材料及病毒株系進行試驗, 確認 ZYMV 經種子傳播的特性, 同時據以擬訂標準檢測流程供瓜類種子中 ZYMV 的檢驗。

材料與方法

ZYMV 檢測方式比較

以 ZYMV 冬瓜分離株 (31B05) 作為供試病毒, 接種栗南瓜 (*Cucurbita maxima* Duch) 「味平」, 新葉出現病徵後採植株葉片, 以純水研磨淬取汁液, 經 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 系列稀釋後, 當檢體進行以下試驗。

生物分析 (bioassay): 以等量 0.1 M 磷酸緩衝液 (KPB buffer) 與系列稀釋的檢體混合製備成接種源, 磨擦接種至奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片, 共 6 株 (6 重複, 採拉丁方格設計)。接種之植株置於隔離網室內, 連續觀察 7–10 d 後由局部病斑的出現, 檢測供試檢體中具有感染力的病毒之數量, 也是傳統

的病組織中病毒耐稀釋性 (dilution end point; DEP) 測定。

聯抗體免疫分析 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA): 本試驗所用 ZYMV 多元抗血清為先前實驗室所製備保存 (Hseu 1985), 免疫球蛋白 (immunoglobulin G; IgG) 純化及酶聯抗體免疫分析 (ELISA) 沿襲 Clark & Adams (1977) 的方法。取上述系列稀釋的 ZYMV 檢體, 以等量 coating buffer 混合後, 經間接法 (indirect) ELISA (Lommel *et al.* 1982) 進行試驗, 再以 ELISA 讀值機 (Multiskan Ascent, Thermo, Finland) 測定盤中各穴樣品在 405 nm 之吸收值 (A_{405})。一般測試樣品的 ELISA 讀值若超過負對照組的 2 倍, 即判定為正反應 (有病毒檢出)。

西方墨漬法 (western blot): 依據 Towbin *et al.* (1979) 的方法, 將系列稀釋的 ZYMV 檢體以含有 1% SDS 的 12% polyacrylamide 進行膠體電泳 (SDS-PAGE) 後, 把膠體放入轉漬槽內, 將蛋白轉漬於 0.45 μ m 硝化纖維紙 (nitrocellulose paper) 上, 再與 ZYMV 抗體反應, 然後加入以鹼性磷酸酶標定之山羊抗兔免疫球蛋白 (Sigma A8233), 反應後再以基質 nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) 及 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt (BCIP) 加入呈色。

反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR): 系列稀釋的供試材料以 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, CA, USA) 進行全量 RNA 之萃取純化, 利用 MMLV reverse transcriptase ($50 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$, Startagene) 合成 1st strand cDNA, 利用專一性引子對: ZYMV-CP-5' ($5'$ -GGTTCATGTCCCAC-CAAGC-3') 及 ZYMV-CP-3' ($5'$ -ATGTGCGATATCACATTTCC-3') 增幅 NIB/CP 片段 (Yakoubi *et al.* 2008) 進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 檢測 ZYMV。分別取 $1 \mu\text{L}$ RNA、 $2 \mu\text{L}$ 0.5PC 引子及 $15 \mu\text{L}$ DEPC-DW, 加入 AccuPower RT/PCR Premix tube (Bioneer, Korea) 中混合均勻, 將反應液置於 MultiGene TC-9600 Thermo Cycler (Labnet, Edison, NJ,

US) 中進行增幅反應，反應溫度及時間：70°C 5 min 及 10°C 10 min (for denature)；42°C 60 min 及 95°C 10 min (for RT)；95°C 30 s；50°C 30 s；72°C 60 s，共 30 個循環，最後一個循環中 72°C 下聚合 10 min。反應結果以 1.2% 瓊脂電泳進行分析，預期可得 605 bp 的 DNA 產物。

瓜類種子 ZYMV 檢測的標準程序

群體測試 (Group testing) 採樣：每個批號送驗的樣本 (submitted sample) 至少 1,000 粒種子，試驗時供試樣本 (working sample) 分別從送驗樣本隨機取樣，共取 690 粒種子進行群體測試：以 1 粒 (10 組)、3 粒 (10 組)、5 粒 (10 組)、10 粒 (10 組)、100 粒 (5 組) 為標準，1 組為 1 個檢體 (Specimen)，每次測試 45 個檢體。

供試檢體製備：以純水 (每毫升 1 粒種子) 振盪洗滌每組種子外層，浸泡並搖盪過夜，取出懸浮液為供試檢體。

檢測方法：以自製的 ZYMV 抗血清所製備的免疫球蛋白試劑進行間接法 ELISA，每一個 ELISA 微量盤進行 45 個檢體加上正負對照組進行試驗，檢測結果若有疑慮時，輔以 RT-PCR (Yakoubi *et al.* 2008) 確認檢測結果。

檢測結果的統計分析：計算群體測試各群組中 ZYMV 正反應的個數，以 Seedhealth 程式 (Chiang *et al.* 2007) 演算出送驗樣本中 ZYMV 的檢出百分率 (proportion)，並含上下可信賴區間 (confidence interval)。

檢出率 (Incidence)：以上檢測的檢出率為種子帶病毒 (seed-carried) 的百分率。

出芽試驗 (Growing-out test)：供試種子直接播種於穴盤中，發芽後連續追蹤觀察 1 mo，於苗株第 1 對本葉展開時，取苗株組織進行 ELISA 檢測，其結果係測試病毒經種子傳染子代苗 (seed to seedling) 的能力。

南瓜種子帶 ZYMV 檢疫檢測實例

2015 年 4 月防檢局送驗 2 個批號 (seed lots)：9894C-AN 及 9894C-AO 的南瓜種子各 1000 粒，利用上述檢疫檢測的標準程序進行 ZYMV 之檢測。

胡瓜種子中 ZYMV 的檢測

以 ELISA 篩檢市售胡瓜 (*Cucumis sativus* L.) 種子是否帶有 ZYMV，供試品種有「秀綠」(‘Shiou-leu’)、「文秀」(‘Wen-shiou’)、「阿秀」(‘A-shiou’)、‘F-1786’、「新嬌」(‘Sin-jau’)、「萬吉」(‘Vantage’)、「彩綠二號」(‘Bountiful No.2’)、「華燕」(‘Fa-yen’)、及「鳳燕」(‘Feng-yen’) 等。取上述各品種種子播種於溫室，栽培長至第 1 對本葉時期，以 ZYMV 病汁液磨擦接種植株子葉及第 1 對本葉，每個品種試驗 6 重複。供試植物置於隔離網室中，連續觀察病徵發展，採收前以 ELISA 分別檢測植株上下各部位組織，確認 ZYMV 感染與否。

採集接種後發病的胡瓜罹病株果實，以 ELISA 檢測鮮採的種子帶有 ZYMV 的比率，並解剖分離種皮及皮下含胚與胚乳組織的部分，分別檢測；新鮮種子乾燥保存 15 d，再以蒸餾水浸潤 2 d 後行解剖分離各供試種子的種皮及皮下含胚與胚乳組織，分別檢測。

收集罹病株種子，播種於泥炭土為介質的穴盤中，連續追蹤觀察 1 mo，同時記錄病徵，並於苗株第 1 對本葉展開時，取脫落的種皮、未脫落的子葉與第 1 對本葉部分葉組織進行病毒檢測。

西瓜種子中 ZYMV 的檢測

2013 年 5 月調查田間瓜類病毒病害時，發現有西瓜 (*Citrullus vulgaris* Schrad. ex Eckkl. & Zeyh) 「甜美人」(‘Tien-Mei-Zen’) 及「黑美人」(‘Dark Belle’) 的植株感染 ZYMV，採其果實隔離挑取果蒂、果底、果皮、外果肉、內果肉及果中柱等組織以 ELISA 檢測，均有 ZYMV 侵染現象。採集果實中所有未成熟及已成熟的種子，分別以 ELISA 進行病毒檢測。剩餘種子置於 10°C 冰箱保存 13 mo，再行取出以 ELISA 進行病毒檢測。收集罹病株種子，播種於泥炭土為介質的穴盤中，連續追蹤觀察 1 mo，同時記錄病徵，並於苗株第 1 對本葉展開時，取脫落的種皮、未脫落的子葉與第 1 對本葉部分葉組織進行病毒檢測。

結果

病毒檢測方法比較

ZYMV 經 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 系列稀釋後進行生物分析、間接法酶聯抗體免疫分析、西方墨漬法及反轉錄聚合酶連鎖反應等檢定法之結果比較如圖 1。在病毒的 DEP 是 10^{-4} 的情形下，反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 的檢測靈敏度為 10^{-6} ，以自製的免疫檢定試劑用於西方墨漬法可有效測得 10^{-2} 稀釋的檢體，用於 ELISA 則為 10^{-3} 。因此，試驗中 ZYMV 檢定的標準流程，以間接法 ELISA 作為例行檢測的主要方法，檢測結果若有虞慮，必要時以 RT-PCR 確認之。

南瓜種子帶 ZYMV 檢疫檢測實例

以檢測標準程序進行南瓜種子 ZYMV 之檢疫檢測，種子批號 9894C-AO 的 45 個檢體都是負反應；但種子批號 9894C-AN 的 10 個檢體 (1 粒種子/檢體) 中有 0 個為正反應，10 個檢體 (3 粒種子/檢體) 中有 1 個為正反應，10 個檢體 (5 粒種子/檢體) 中有 1 個為正反應，10 個檢體 (10 粒種子/檢體) 中有 0 個為正反應，5 個檢體 (100 粒種子/檢體) 中有 1 個為正反應。

利用 Seedhealth 程式演算出送驗樣本中 ZYMV 的檢出率及信賴區間，批號 9894C-AN 的種子中 ZYMV 的檢出率是 $0.47 \pm 0.46\%$ ，批號 9894C-AO 的種子中 ZYMV 的檢出率是 0。

取 2 個正反應的檢體 (9894C-AN-5-5 及 9894C-AN-100-5)，1 個負反應的檢體 (9894C-AN-3-2) 及純水 (CK) 做對照，進行檢測標準程序中 RT-PCR 的步驟，結果如圖 2 所示。正反應的檢體都可增幅出 605 bp 的核酸產物，經解序與 BLAST 比對，該片段與 GenBank Accession HM005312 (ZYMV poly-protein gene of watermelon in Mali) 有 93% 相同度 (Identity)。

胡瓜種子中 ZYMV 的檢測

ZYMV 接種胡瓜「新嬌」、「萬吉」、「彩綠二號」、「華燕」(圖 3A)、「鳳燕」等品種因具有部份抗性，果實與種子以 ELISA 檢測均無 ZYMV 檢出。胡瓜「秀綠」、「文秀」、「阿秀」(圖 3B)、「F-1786」等品種極感病，取其罹病株果實，在新鮮種子中可測得 26% (11/42) 帶有 ZYMV，且病毒僅存在於種皮 (ELISA $A_{405} = 1.253$)，皮下含胚與胚乳組織的部分無病毒檢出 (ELISA $A_{405} = 0.014$)。新鮮種子乾燥保存

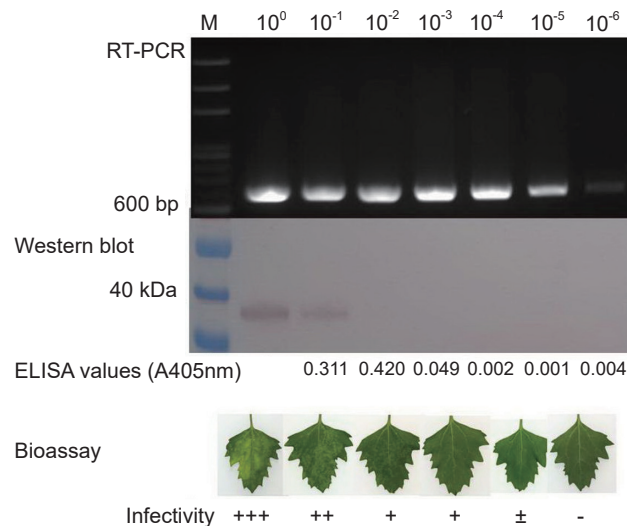


圖 1. 反轉錄聚合酶連鎖反應、西方墨漬法抗體檢定、酶聯抗體免疫分析、及生物分析檢定 ZYMV 的靈敏度比較。

Fig. 1. Comparisons of sensitivities for detection of ZYMV by RT-PCR, western blot, ELISA and bioassay.

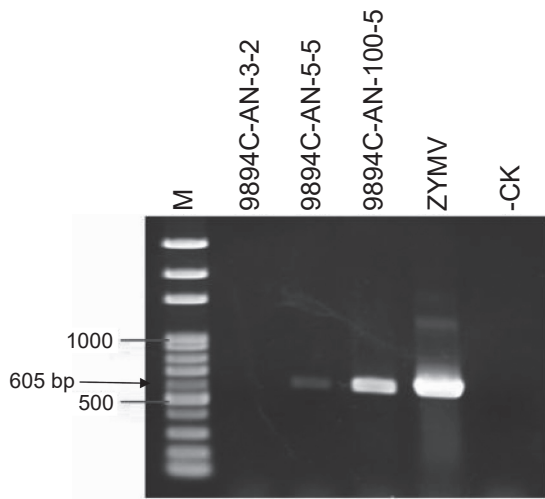


圖 2. 以 RT-PCR 確認 ELISA 反應的結果：2 個正反應的檢體 (9894C-AN-5-5 及 9894C-AN-100-5) 及 1 個負反應的檢體 (9894C-AN-3-2)，正反應的檢體可增幅出 605 bp 的核酸產物。

Fig. 2. Confirmation of ELISA-positive specimens (9894C-AN-5-5 and 9894C-AN-100-5) and negative specimen (9894C-AN-3-2) by RT-PCR. A 605 bp fragment was yielded by the PCR.

15 d 後，全數供試 45 粒種子的種皮或皮下含胚與胚乳組織的部分均無法檢出 ZYMV。出芽試驗供試 45 株苗，全數無 ZYMV 檢出。

西瓜種子中 ZYMV 的檢測

從佈滿 ZYMV 的西瓜罹病果實中採集的新鮮種子，極易測得病毒，如圖 4 所示。雖然西瓜「黑美人」成熟的種子中有 58%，未熟的種子中有約 69% 測不到 ZYMV。但是如圖 5 所示，「甜美人」成熟的種子 98%，未熟的種子 100% 都可測到 ZYMV。「甜美人」成熟的種子在低溫乾燥保存 13 mo 後再行檢測，仍有 60% 可檢出 ZYMV (圖 5)。但出芽試驗 90 株苗，全數無 ZYMV 檢出。

討論

比較文內 ZYMV 的各種檢測方法，抗體有效僅達 10^{-2} ，接種試驗僅達 10^{-4} ，RT-PCR 可達 10^{-6} 。短時間內需完成大量標本的檢測時，目前仍以 ELISA 最為實用，但 ELISA 檢

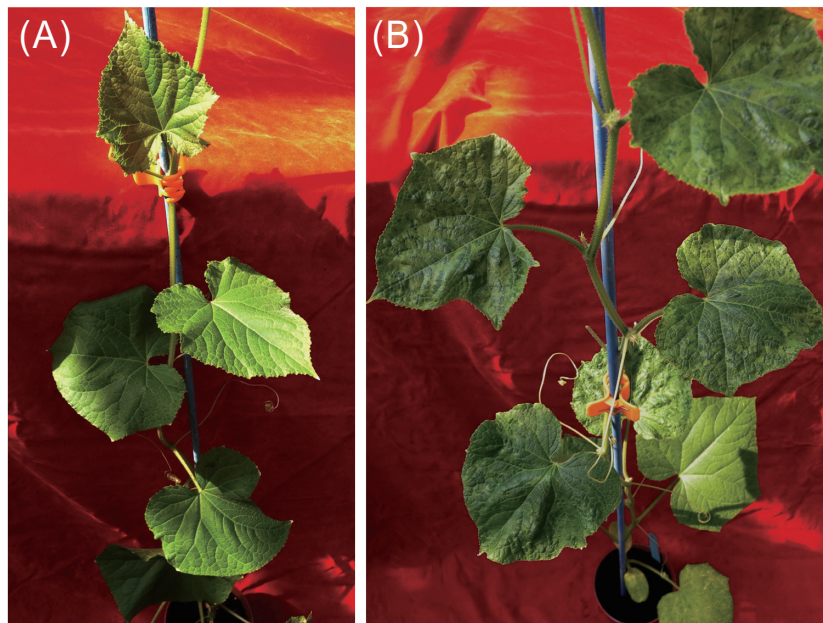


圖 3. 胡瓜「華燕」接種 ZYMV，上位葉無病徵，以 ELISA 檢驗無 ZYMV 檢出 (A)；胡瓜「阿秀」接種 ZYMV 後，系統性感染造成上位葉的病徵 (B)。

Fig. 3. Inoculation assay on different cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Following inoculation with ZYMV, no symptom was observed and no virus was detected on upper leaves of cucumber cv. 'Fa-yen' (A); as compared to the systemically developing symptoms shown on cucumber cv. 'A-shiou' (B).

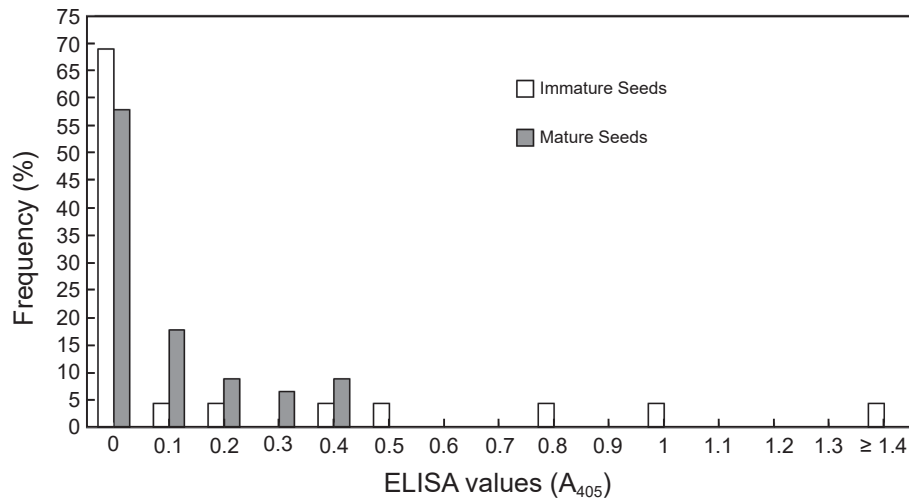


圖 4. 間接法 ELISA 檢測感染 ZYMV 的西瓜品種「黑美人」，所有樣本在各反應值 (A_{405}) 的檢出頻率比較。

Fig. 4. Comparative frequency of indirect ELISA values (A_{405}) of seeds derived from ZYMV-infected watermelon cv. 'Dark Belle'.

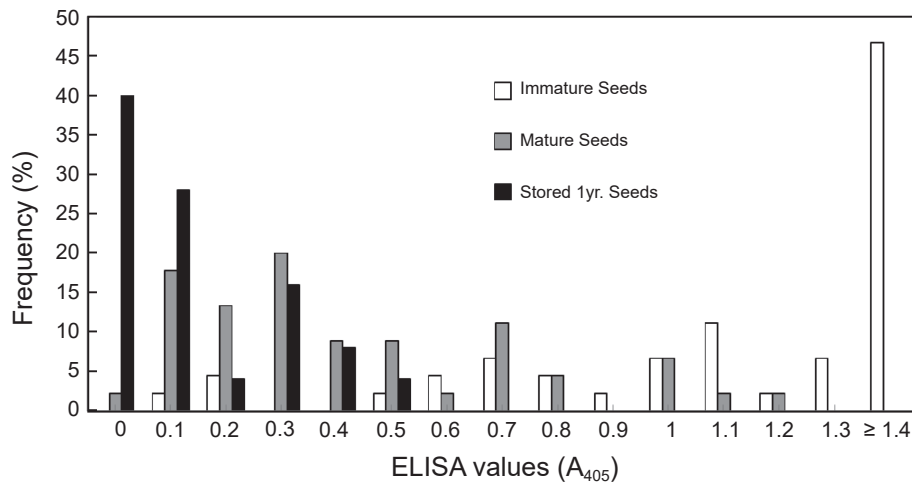


圖 5. 間接法 ELISA 檢測感染 ZYMV 的西瓜品種「甜美人」，所有樣本在各反應值 (A_{405}) 的檢出頻率比較。

Fig. 5. Comparative frequency of indirect ELISA values (A_{405}) of seeds derived from ZYMV-infected watermelon cv. 'Tien-Mei-Ren'.

測出現臨界值時，需以靈敏度最高的 RT-PCR 結果來判斷。Yakoubi *et al.* (2008) 報告的 RT-PCR 來檢測 ZYMV，尤其是引子對的設計，是我們與其他方法比較之後，發現較有效率的方法，因此引用來當標準檢測程序之一。

多數前人研究有關 ZYMV 經種子傳播的試驗都是以南瓜 (*Cucurbita* sp.) 為寄主，最終結論是正面認定會經種子傳播 (Davis &

Mizuki 1986; Greber *et al.* 1988; Schrijnwerkers *et al.* 1991; Robinson *et al.* 1993; Fletcher *et al.* 2000; Tobias & Palkovics 2003; Muller *et al.* 2006; Coutts, *et al.* 2011; Simmons, *et al.* 2011; Lestari & Nurhayati 2014; Sevik & Balkaya 2015; Harth *et al.* 2016)，但其中也有負面認定不會經種子傳播 (Nameth *et al.* 1985; Provvidenti & Robinson, 1987; Greber *et al.*

1987; Gleason & Provvidenti 1990; Robinson *et al.* 1993; Wong *et al.* 1994)。此外，以甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 為寄主的試驗，都是負面結論 (Lecoq *et al.* 1981; Provvidenti & Robinson 1987)，唯一胡瓜的試驗，也是負面結論 (Robinson *et al.* 1993)。本研究試驗顯示，ZYMV 會經南瓜、胡瓜、及西瓜種子傳播的事實，當 ZYMV 系統性感染西瓜及胡瓜植株時，病毒可侵染到果實中，散佈至果實內所有果肉組織中，污染到種子或其衍生組織，因此種皮可測到病毒的存在，尤其是新鮮或未成熟的種子，但多數種皮以內含胚乳層及種胚部份則無病毒可檢出。雖然一系列的報告指出 ZYMV 會侵染至種胚 (embryonic infection)，造成病毒由種子傳染至子代苗 (seed-to-seedling transmission) 的垂直傳染 (vertical transmission) 現象 (Simmons *et al.* 2011; Simmons *et al.* 2013; Harth *et al.* 2016)，但是這所有試驗都僅以一個南瓜品種 (*Cucurbita pepo* ssp. *texana*) 為材料。我們的試驗結果顯示，ZYMV 種傳率隨瓜的種類而異，胡瓜、西瓜和南瓜的狀況各不相同，同一種瓜也隨品種間對病毒的感受性 (susceptibility) 而異，抗病胡瓜品種全無 ZYMV 種傳問題；西瓜「黑美人」種子帶病毒率明顯較低 (較不易被檢出) 應是具有抗病性，使 ZYMV 在果實內移行受限。雖然 Simmons *et al.* (2015) 有試驗證實轉基因抗 ZYMV 的南瓜品種不能免除病毒經種子的垂直傳染，但若寄主抗病機制是抑制病毒移行，使 ZYMV 未能系統性感染植株，而無病毒蔓延至果實內，就應無種子被侵染，也無病毒經種子垂直傳染至子代苗的問題。

胡瓜和西瓜種子帶有病毒係在果肉內種子形成過程中 ZYMV 污染到外部種皮所致，病毒無法在成熟鞘化的種皮上繁殖，所以成熟的種子上檢出的病毒量較未成熟的種子少，且經採種程序乾燥貯存後，絕對寄生但未入侵至種胚的 ZYMV 多數遭自然消退 (denature)，餘存的病毒量也較難檢出。自 ZYMV 感染的胡瓜及西瓜果實所採的種子及檢測帶有 ZYMV 的南瓜種子，經出芽試驗，觀察長出的實生苗，證實全數種子皆無傳染 ZYMV 的能力，因此 ZYMV 感染第二代瓜苗的機會甚低。

Robinson *et al.* (1993) 也曾報告採自 ZYMV 感染株的數萬顆南瓜或胡瓜種子，經溫室內出芽試驗，結果第二代瓜苗皆無病毒感染。Simmons *et al.* (2013) 認為 ZYMV 在 *C. pepo* ssp. *texana* 種子感染率高達 21.9%，但傳染到子代苗只有 1.6%，有所謂棲群瓶頸 (population bottleneck) 效應的發生。因此，很明顯種子帶病毒率 (seed-carried rate) 不等於種子傳播率 (seed-transmitted rate)。

結論

瓜類種子國際貿易、跨國採種或種源交換日趨頻繁，病毒經種子媒介傳播入境的風險也日增，為了檢疫與防疫之需，必須有一套被世界各國接受的標準程序檢測種媒病毒 (Maddox 1997)。本文證實 ZYMV 可被南瓜、胡瓜、及西瓜種子傳播，於是針對這 3 種瓜類，擬訂 ZYMV 檢測的標準程序，包括送驗樣品數、群體測試的採樣及統計分析、供試樣品製備、適合的檢驗方法及檢測結果的表示等。依國際種子檢查規則，檢測結果應以受感染數的百分比，或一定重量樣品內檢出的病毒數表示。至於在作物健康管理防疫策略內，種子攜帶 ZYMV 的容許率在不同瓜類不同品種均有待訂定，但在檢疫檢測時之檢出率容許度 (tolerance) 應為 0。

誌謝

本研究經費由農委會農業試驗所科技計畫 (104 農科-9.7.3-農-C2 及 105 農科-9.7.3-農-C2) 補助，謹致謝忱。

引用文獻

- Al-Musa, A. M. 1989. Severe mosaic caused by zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Jordan. *Plant Pathol.* 38:541-546.
- Chiang, K. S., T. C. Deng, H. H. Lai, and S. F. Wang. 2007. A statistical method to estimate virus seed-transmission rate by results of group tests. *Plant Pathol. Bull.* 16:225-229. (in Chinese with English abstract)

- 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.
- Coutts, B. A., M. A. Kehoe, C. G. Webster, S. J. Wylie, and R. A. C. Jones. 2011. Zucchini yellow mosaic virus: Biological properties, detection procedures and comparison of coat protein gene sequences. *Arch. Virol.* 156:2119–2131.
- Davis, R. F. and M. K. Mizuki. 1986. Seed transmission of zucchini yellow mosaic virus in squash. *Phytopathology* 76:1073.
- Desbiez, C. and H. Lecoq. 1997. *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Pathol.* 46:809–829.
- Fletcher, J. D., A. R. Wallace, and B. T. Rogers. 2000. Potyviruses in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): Yield and quality effects of ZYMV and WMV 2 virus infections. *New Zeal. J. Crop. Hort. Sci.* 28:17–26.
- Gleason, M. L. and R. Provvidenti. 1990. Absence of transmission of zucchini yellow mosaic virus from seeds of pumpkin. *Plant Dis.* 74:828.
- Greber, R. S., G. D. McLean, and M. S. Grice. 1987. *Zucchini yellow mosaic virus* in three States of Australia. *Aust. Plant Pathol.* 16:19–21.
- Greber, R. S., D. M. Persley, and M. E. Herrington. 1988. Some characteristics of Australian isolates of zucchini yellow mosaic virus. *Aust. J. Agric. Res.* 39:1085–1094.
- Harth, J. E., H. E. Simmons, and A. G. Stephenson. 2017. Vertical infection of *Zucchini yellow mosaic virus* via pollen transmission occurs at a lower frequency than ovule transmission. *Eur. J. Plant Pathol.* 147:717–720.
- Hseu, S. H., H. L. Wang, and C. H. Huang. 1985. Identification of a *Zucchini yellow mosaic virus* from *Cucumis sativus*. *J. Agric. Res. China* 34:87–95. (in Chinese with English abstract)
- Lecoq, H., C. Desbiez, C. Wipf-Scheibel, and M. Girard. 2003. Potential involvement of melon fruit in the long distance dissemination of cucurbit potyviruses. *Plant Dis.* 87:955–959.
- Lecoq, H., M. Pitrat, and M. Clement. 1981. Identification and characterization of a potyvirus causing yellow stunt of melon. *Agronomie* 1:827–834.
- Lestari, S. M. and E. Nurhayati. 2014. Seed transmission efficiency of squash mosaic virus on Cucurbitaceae. *J. Fitopathol. Indonesia* 10:81–86. (in Indonesian with English abstract)
- Lisa, V., G. Boccoardo, G. D'Agostino, G. Dellavalle, and M. D'Aquilio. 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology* 71:667–672.
- Maddox, D. A. 1997. Regulatory needs for standardized seed health tests. p.81–92. *in: Plant Pathogens and the Worldwide Movement of Seeds* (McGee, D. C., ed.). APS Press. St. Paul, MN. 109 pp.
- Müller, C., H. Bröther, S. Von Bargaen, and C. Buttner. 2006. *Zucchini yellow mosaic virus* - Incidence and sources of virus infection in field-grown cucumbers and pumpkins in the Spreewald, Germany. *J. Plant Dis. Prot.* 113:252–258.
- Names, S. T., J. A. Dodds, A. O. Paulus, and A. Kishaba. 1985. *Zucchini yellow mosaic virus* associated with severe diseases of melon and watermelon in southern California desert valleys. *Plant Dis.* 69:785–788.
- Provvidenti, R. and R. W. Robinson. 1987. Lack of seed transmission in squash and melon plants infected with zucchini yellow mosaic virus. *Cucurbit Genet. Coop. Rpt.* 10:81–82.
- Riedle-Bauer, M., B. Suarez, and H. J. Reinprecht. 2002. Seed transmission and natural reservoirs of *Zucchini yellow mosaic virus* in *Cucurbita pepo* var. *styriaca*. *J. Plant Dis. Prot.* 109:200–206.
- Robinson, R. W., R. Provvidenti, and J. W. Shail. 1993. Tests for seedborne transmission of zucchini yellow mosaic virus. *HortScience* 28:694–696.
- Schrijnwerkers, C. C. F. M., N. Huijberts, and L. Bos. 1991. Zucchini yellow mosaic virus; Two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. *Neth. J. Plant Pathol.* 97:187–191.
- Sevik, M. A., and A. Balkaya. 2015. Seed transmissibility of viruses in winter squash landraces collected from the Black Sea region of Turkey. *Plant Prot. Sci.* 51:195–199.
- Simmons, H. E., E. C. Holmes, F. E. Gildow, M. A. Bothe-Goralczyk, and A. G. Stephenson. 2011. Experimental verification of seed transmission of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Dis.* 95:751–754.
- Simmons, H. E., J. P. Dunham, K. E. Zinn, G. P. Munkvold, E. C. Holmes, and A. G. Stephenson. 2013. *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, Potyvirus): Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *Virus Res.* 176:259–264.
- Simmons, H. E., H. R. Prendeville, J. P. Dunham, M. J. Ferrari, J. D. Earnest, D. Pilson, G. P. Munkvold, E. C. Holmes, and A. G. Stephenson. 2015. Transgenic virus-resistance in crop-wild *Cucurbita pepo* does not prevent vertical transmission of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Dis.* 99:1616–1621.
- Tóbiás, I. and L. Palkovics. 2003. Characterization of Hungarian isolates of *Zucchini yellow mosaic vi*

- rus* (ZYMV, potyvirus) transmitted by seeds of *Cucurbita pepo* var *Styriaca*. *Pest Manag. Sci.* 59:493–497.
- Towbin, H., S. Theophil, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350–4354.
- Wong, S. M., C. G. Chng, C. Y. Chng, and P. L. Chong. 1994. Characterization of an isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* from cucumber in Singapore. *J. Phytopathol.* 141:355–368.
- Yakoubi, S., C. Desbiez, H. Fakhfakh, C. Wipf-Scheibel, F. Fabre, M. Pitrat, M. Marrakchi, and H. Lecoq. 2008. Molecular, biological and serological variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Tunisia. *Plant Pathol.* 57:1146–1154.

Seed Transmissibility and Detection of *Zucchini yellow mosaic virus* in Cucurbits

Ting-Chin Deng^{1,*}, Chin-Hui Tsai², Yi-Ting Lin², and Chien-Ming Chou³

Abstract

Deng, T. C., C. H. Tsai, Y. T. Lin, and C. M. Chou. 2017. Seed transmissibility and detection of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits. *J. Taiwan Agric. Res.* 66(3):230–239.

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) had been comparatively detected by bioassay, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), western blot, and reverse transcription-PCR (RT-PCR). Accordingly, a standard operating procedure for detection of ZYMV carried by cucurbit seeds was set. The procedure includes sampling technique and statistical analysis mode for group test, specimen preparation for testing, acceptable methods for ZYMV detection, and formal expression of tested results. To practice the procedure, a seed lot of *Cucurbit* sp. for quarantine test was tested by ELISA and the proportion of positive was $0.47 \pm 0.46\%$ calculated by 'Seedhealth' program. ZYMV involved in these positively detected specimens were confirmed by the analysis of RT-PCR and the nucleotide sequencing of RT-PCR products. However, no seedlings from the same seed lot were infected by ZYMV when tested by growing-out test. All tested seeds collected from 9 local commercial cucumber cultivars were detected to be completely negative. Plants of various cucumber cultivars were inoculated with ZYMV, no virus was detected in fruit or seed derived from some resistant cultivars; whereas, ZYMV-infected fruits were harvested from symptomatic plants of susceptible cultivars. The incidence of ZYMV on fresh seeds in infected fruits was estimated to be 26%; even so, the virus became undetectable after dry preservation of the seeds for 15 d. The distribution of ZYMV on fruit of watermelon was observed, and the virus was found in fresh pedicle, fruit base, fruit peel, outer pulp, inner pulp and innermost pulp. Immature seeds contained more virus than that of mature seeds. Regularly, it's easier to detect ZYMV in seeds of watermelon cv. 'Tien-Mei-Zen' than that of 'Dark Belle'. The virus was still detectable in 60% of the 'Tien-Mei-Zen' seeds stored at 10°C for 1 yr, but the seed transmission rate detected by growing out test was kept 0.

Key words: Standard operating procedure, Virus indexing, Cucumber, Watermelon, Pumpkin.

Received: October 26, 2016; Accepted: November 24, 2016.

* Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw

¹ Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.