

## 番茄捲葉病毒之偵測

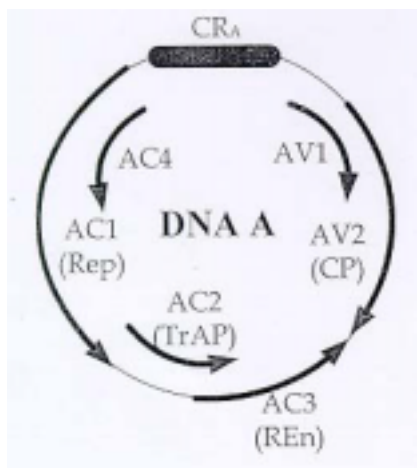
文/圖 彭瑞菊、鄭安秀

### 前言

番茄的病毒病主要有番茄嵌紋病毒病、胡瓜嵌紋病毒病、馬鈴薯 Y 病毒病、番茄斑點萎凋病毒病及番茄捲葉病毒病。番茄捲葉病毒病由 Tomato leaf curl virus (TLCV) 或 Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) 所引起，是番茄主要病害之一，病毒感染後造成葉片黃化及捲曲等病徵，所造成番茄經濟損失可高達百分之百，番茄捲葉病毒病只經由一種媒介昆蟲即銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii*) 傳播。銀葉粉蝨密度越高，番茄捲葉病毒病發生越嚴重。

### 病毒及病徵簡介

番茄捲葉病毒為雙生病毒科，*Begomovirus* 屬，是由兩個 T=1 的二十面體所組成雙生粒子，大小約 18 ×30 nm，其病毒顆粒中包含環狀的單股 DNA 基因體，為單一基因體 (缺少 DNA B)，其 DNA 大小約 2800 個核苷酸。其基因體為 Ambisense，包含六個 open reading frames (ORFs)，AV1 基因具有類似移動蛋白 (movement protein; MP) 之功能；AV2 基因外鞘蛋白 (coat protein; CP)；AC1 基因複製啟動蛋白 (replication initiator protein; Rep protein)；AC2 基因轉錄活化蛋白 (transcription activator protein)；AC3 基因複製增強蛋白 (replication enhancer protein)；AC4 基因無扮演任何角色。



- ◀ 番茄捲葉病毒的基因體，六個 OPFs，AV1、AV2、AC1、AC2、AC3 及 AC4；另外 CR<sub>A</sub> 為 common region

番茄捲葉病毒所造成的病徵顧名思義，即造成番茄葉捲曲、黃化，尤其是頂葉黃化捲曲特別明顯。



▲ 番茄捲葉病毒頂葉黃化、葉捲曲

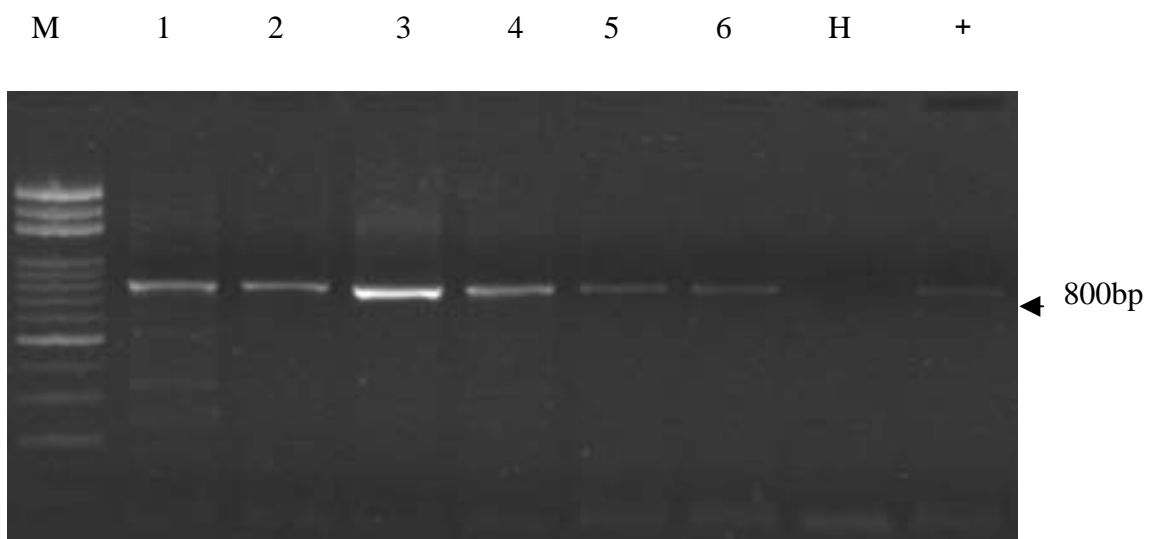
### 番茄捲葉病毒診斷法

1. 光學顯微鏡診測法：觀察病毒在植物體內所造成的細胞核內含體，本屬病毒內含體侷限韌皮組織之篩管細胞內，但濃度低且不穩定。
2. 血清診測法：製作單株抗體和多株抗體作為偵測工具，應用免疫擴散法或酵素連結免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 等方法。利用血清來偵測不同種的雙生病毒，會因為寄主植物與其他病毒複合感染不易分離，病毒穩定性不高，濃度低不易純化，使得抗血清製作不易。
3. 聚合酶連鎖反應：是目前廣泛應用且靈敏性較高的一項技術，利用設計一對專一性的引子對，就可以很快增幅所要的片段。但必需先從植物萃取核苷酸，再純化病毒 DNA，耗時良久。
4. 組織點漬法：直接將植物汁液印於硝化纖維膜上，配合核酸雜何反應，可有效且直接對感病葉片進行偵測，但會因葉綠素或其他色素影響結果。

### 番茄捲葉病毒聚合酶連鎖反應檢測

1. 簡易 DNA 抽取：取植物葉片 0.2g，加入 2ml 的 TE 緩衝液 (50mM Tris-HCL, pH8.0, 10mM EDTA, pH 8.0)，磨碎後離心 14,000g、30 分鐘，吸取 50  $\mu$ l 上清液至微量離心管中，置於 4°C 冰箱 30 分鐘，去除上清液，再用 200  $\mu$ l 的 TE 緩衝液清洗微量離心管三次，此微量離心管上會吸附植物 DNA，可直接進行聚合酶連鎖反應。
2. 聚合酶連鎖反應：  
由中興大學農業生物科技研究所胡仲祺老師所提供的對應外鞘蛋白基因的引子對 GCP-1 (5'-GGCATGCCATGGCGAAGCGACCCGCCG-3') (+)、GCP-2 (5'-GCGCGGATCCTTAATTTTGTATCGAATCATAG-3') (-)。在反應溶液 20  $\mu$ l 中，包含 0  $\mu$ l DNA (在管壁上)、1  $\mu$ l 引子 (+)、引子 (-)、2  $\mu$ l 10x 緩衝液、5  $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ l 2.5mM dNTP、8.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

及 0.5  $\mu$ l Taq DNA 聚合酶 (後加, 保持在 80°C 時再加入), 反應時所用的機型為 Hybrid 熱循環反應儀 (PCR EXPRESS Hybrid), 設定反應時間如下為 94°C 5 分鐘後、維持在 80°C, 此時加入 Taq DNA 聚合酶, 94°C 3 分鐘、45°C 5 分鐘、72°C 5 分鐘, 一個循環後, 94°C 1 分鐘、50°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘, 30 個循環, 最後以 72°C 5 分鐘進行 1 個循環, 反應完成後取 1  $\mu$ l 的反應物進行 1% 洋菜膠體電泳分析, 經聚合酶連鎖反應後會增幅出一 800bp 左右的 DNA 片段。



▲ 1% 洋菜膠體電泳分析圖, M 為 100 bp Marker、1-6 為田間所摘取罹病番茄、H 為健株、+ 為罹患番茄捲葉病毒的植株

### 結語

目前本場利用聚合酶連鎖反應來偵測番茄捲葉病毒, 是一快速有效的診測方法, 可以幫助在病害發生早期, 提醒農民加強防治銀葉粉蝨, 減少病毒傳播的機會。

本場試種由以色列引入 3 個耐番茄黃化捲葉病毒之商業品種, 試種結果抗病性良好, 田間並未出現典型黃化捲葉病徵, 將心葉取下以專一性引子對進行聚合酶連鎖反應後, 並沒有產生 800bp 的片段, 不過測試 45 株中, 有 3 株產生非專一性的 binding 片段, 是否和抗病強弱有關, 值得加以深入探討。