

番茄種子種苗帶毒率檢測及種子去病毒方法之研究

文/圖 彭瑞菊、陳紹崇

前言

雲嘉南地區為番茄主要的栽培區，依台灣農業年報資料 96 年栽培面積達 1,768 公頃，佔全國栽培面積的 45.7%，常見之病蟲害如病毒病、青枯病、細菌性斑點病、根瘤線蟲、早疫病、晚疫病、黑葉黴病、銀葉粉蝨、斑潛蠅、蚜蟲、番茄夜蛾、甜菜夜蛾等。番茄的病毒病害主要有：番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus* ; ToMV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus* ; CMV)、番茄捲葉病毒 (*Tomato leaf curl virus* ; TLCV or *Tomato yellow leaf curl virus* ; TYLCV)、馬鈴薯病毒 Y (*Potato virus Y* ; PVY) 及番茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spotted wilt virus* ; TSWV)，病徵依感染的病毒種類、栽培品種及環境因素而異，罹病植株葉片呈現黃綠不均的嵌紋，偶有壞疽條斑或水浸狀斑，或呈凹凸不平、皺縮、畸形，新葉顏色變淡黃、葉片縮小、變細如細繩狀或植株矮小，嚴重者生長停頓，甚至枯死，且番茄病毒病之田間複合感染情況相當普遍，嚴重時罹病株率可高達 100%，造成農民嚴重損失。

目前研究顯示番茄種子會帶毒傳播的只有 ToMV，其他病毒不會經由種子帶毒傳播。農民在番茄果實採收後，蒐集種子須先經由酸處理去除種子的果膠，再經過滾筒乾燥去種毛，但是仍有病毒污染種子，因育苗場或是農民育苗後，種苗就有病毒感染的植株，因此本研究擬建立番茄種子去病毒技術。

蒐集市售種子

共計蒐集 75 個品種，包括農友種苗之農友 301、明珠、雙福、新光... 等 39 品種；美大種苗之黃金減肥小番茄、黃金減肥大番茄等 4 品種；台灣農產公司之瀧井交配桃麗、大宮 163 等 8 品種；生生種苗之聖運、西施、萬人緣、黃玉等 4 品種；稼穡種苗之包括大牛 606、紅利 601、紅利 603、紅利 623... 等 10 品種；亞蔬品種之亞蔬 4、5、6... 等 6 品種；其他品種之台南場-金豔、地方品種-西螺黑柿、試交 2 號。

種子及種苗帶病毒檢測

一、種子或種苗全量 RNA 的製備

蒐集市售種子，將種子或種苗(放於 1/2MS 培養基上萌發 10 天)全量 RNA 之製備則是將種子或種苗植株葉片於液態氮中研磨成粉狀，以 Total RNA Reagent (GenMark 公司) 萃取 RNA，以 95% 酒精沉澱後溶解於無菌水中。

二、反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)偵測

針對番茄嵌紋病毒(ToMV)、馬鈴薯 Y 病毒(PVY)、胡瓜嵌紋病毒(CMV)、番茄斑點萎凋病(TSWV)，抽取種子 RNA 進行反轉錄-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)，本實驗所使用之引子對乃是根據已知之 ToMV、PVY、CMV 及 TSWV 核苷酸的序列，設計專一性引子，進行 RT-PCR 反應，PCR 反應後產物以電泳法進行分析，其程序乃遵照一般分子生物技術進行。

三、聚合酶連鎖反應 (PCR)：

針對番茄捲葉病毒 PCR 檢測：

1. 簡易 DNA 的抽取：

取植物葉片 0.2g，加入 2ml TE 緩衝液 (50Mm Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, pH8.0)，磨碎離心 14000g、30 分鐘，吸取 50 μ l 上清液至微量離心管中，至於 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30 分鐘，去除上清液，再

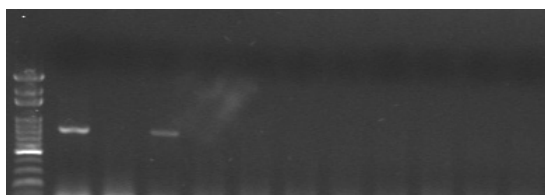
用 200 μ l TE 緩衝液清洗微量離心管 3 次，之後微量離心管上會吸附 DNA，直接進行聚合酶連鎖反應 (PCR) 檢測。

2. 聚合酶連鎖反應 (PCR)：

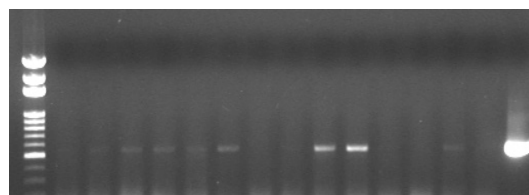
番茄捲葉病毒由專一性引子對 (GCP1/GCP2) 國立中興大學胡仲棋老師提供，進行 PCR 反應。反應完成後進行電泳法進行分析，其程序乃遵照一般分子生物技術進行。

四、種子及種苗檢測結果

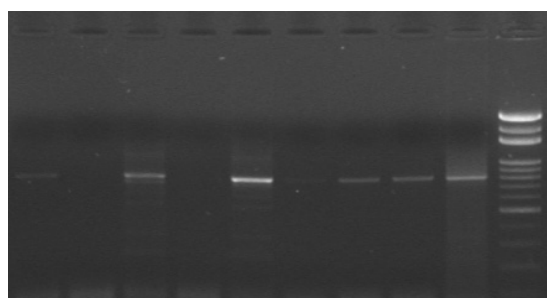
抽取種子 DNA 進行 RT-PCR 偵測 TYLCV；另外抽取種子 RNA 進行 PCR 偵測 ToMV、CMV、PVY 及 TSWV，電泳結果如下：



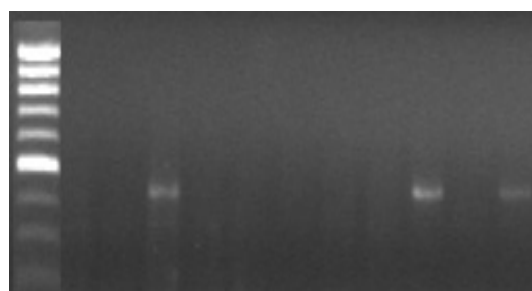
PCR-TYLCV-800bp



RT-PCR-CMV-500bp



RT-PCR-PVY-801bp



RT-PCR-ToMV-480bp

以 PCR 檢測 TYLCV 及以 RT-PCR 檢測 CMV、PVY 及 ToMV 之電泳圖

本研究共蒐集市售番茄種子 75 個品種，共計檢測 75 批種子及 75 批種苗，檢測方法為番茄嵌紋病毒(ToMV)、馬鈴薯 Y 病毒(PVY)、胡瓜嵌紋病毒(CMV)、番茄斑點萎凋病(TSWV)，抽取種子(苗)RNA 進行 RT-PCR，另番茄捲葉病毒(TYLCV)抽取種子(苗)DNA 進行 PCR，檢測結果種子感(污)染番茄捲葉病毒 (TYLCV) 2.3%，番茄嵌紋病毒 (ToMV) 為 3.4%，胡瓜嵌紋病毒(CMV) 為 0.5%，馬鈴薯 Y 病毒(PVY) 為 0.2%，並無檢測到番茄斑點萎凋病(TSWV)。種苗部分感(污)染番茄嵌紋病毒 (ToMV) 為 3.16%，感(污)染番茄捲葉病毒 (TYLCV) 1.88%，並無檢測到其他病毒(表一)。

表一、番茄種子種苗帶毒率檢測

病毒名稱	ToMV	CMV	PVY	TSWV	TYLCV
種子帶病毒百分率	3.4	0.5	0.2	0	2.3
種苗帶病毒百分率	3.16	0	0	0	1.88

番茄種子只會攜帶番茄嵌紋病毒(ToMV)，但是在本實驗中除了 TOMV 外，其他三種病毒-番茄捲葉病毒(TYLCV)、馬鈴薯 Y 病毒(PVY)、胡瓜嵌紋病毒(CMV)，均有檢測到，而種苗上有檢測到 TYLCV，病毒到底是感染種子內部，或污染種子外皮，值得再進一步去探討。

番茄種子去病毒技術之研究

一、磷酸三鈉處理

蒐集番茄園中罹病毒果實，將番茄種子 10 g 裝於 3 cm×6 cm 的紗布袋，置於不同濃度：12.5%、15% 及 20% 的磷酸三鈉溶液浸泡，分別

處理不同時間：15 分、20 分、25 分及 30 分，處理完後以流水沖洗 1 小時，再將種子以 1%次氯酸鈉消毒後，置於 1/2 MS 10 天使其萌發，調查種苗發芽率及帶病毒率。番茄種子以 12.5%之磷酸三鈉處理 30 分鐘及 15%之磷酸三鈉處理 20 分鐘，去病毒最為有效，完全檢測不到帶病毒之種苗，且其發芽率達 95%以上。

二、乾熱處理

蒐集番茄園中罹病毒果實，蒐集種子後，略為陰乾，以乾熱處理，再將種子以 1%次氯酸鈉消毒後，置於 1/2 MS 10 天使其萌發，調查種苗發芽率及帶病毒率，結果，不預熱處理，以 70°C 處理 72 小時，發芽率 83%，種苗帶病毒率為 2.5%，以 48°C 預熱處理 6 或 12 小時，再以 68 或 70°C 處理 24 小時，結果顯示不論預熱 6 或 12 小時，68°C 處理的發芽率可達 95%以上且種苗帶病毒率為 1.2%以下；另以 50°C 預熱處理 6 或 12 小時，再以 68 或 70°C 處理 24 小時，結果顯示不論預熱 6 或 12 小時，68°C 處理的發芽率可達 95%以上且種苗檢測不到病毒。

另有以 52~60°C 預熱處理，再以 62~70°C 乾熱處理，但都會影響發芽率且帶病毒率偏高，故未列於表中。由結果可知不預熱處理直接 70°C 處理三日由於發芽率偏低，不建議採用，建議以 50°C 預熱 6 小時後，再以 68°C 處理 24 小時去病毒效果較佳，完全檢測不到帶病毒之種苗，可推薦種子生產公司採用。

	
<p>番茄果實罹病毒的病徵--果實變形</p>	<p>番茄果實罹病毒的病徵--果實褐變</p>
	
<p>番茄果實罹病毒的病徵--果實褐變</p>	