

番茄黃化捲葉病毒田間監測及銀葉粉蝨傳毒試驗¹

彭瑞菊、陳昇寬²

摘 要

彭瑞菊、陳昇寬. 2006. 番茄黃化捲葉病毒田間監測及銀葉粉蝨傳毒試驗。台南區農業改良場研究彙報 48: 9-15。

番茄捲葉病毒由 Tomato leaf curl virus (TLCV) 或 Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) 所引起，是番茄主要病害之一，感染病毒後引起葉片黃化及捲曲等病徵，所造成之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。番茄捲葉病毒病發生率越高銀葉粉蝨密度亦有增加的趨勢。利用聚合酶連鎖反應來偵測番茄捲葉病毒，包括番茄及銀葉粉蝨的帶毒情形，比較網室栽培與露天栽培之差異及番茄罹病與銀葉粉蝨傳毒的相關性。冬作番茄至收成前調查，網室內罹病度為 0.1%，銀葉粉蝨帶毒率為 10%，銀葉粉蝨密度為 89.2 隻/每張；田間罹病度為 42%，銀葉粉蝨帶毒率為 100%，銀葉粉蝨密度為 68 隻/每張。由於氣候較寒冷，所以網室內的蟲口數反而較高，不過因為是番茄生長後期，番茄植株健壯，所以網室內的罹病度並沒有隨之增高。春作番茄種植後至六月初調查，網室內罹病度為 65%，銀葉粉蝨帶毒率為 70%，銀葉粉蝨密度為 303.3 隻/每張；田間罹病度為 22%，銀葉粉蝨帶毒率為 50%，銀葉粉蝨密度為 591 隻/每張。網室內若是蟲口密度高，三個星期後就可陸續看到罹病株，且隨著蟲口密度增高罹病株數隨之增高。不同生長時期之番茄植株，分別接種不同隻帶黃化捲葉病毒之銀葉粉蝨，以 PCR 檢測植株罹病及觀察發病情形。不論生長期為何，5 隻銀葉粉蝨傳毒率均在 70% 以下，10 隻以上才能達到近 90% 以上的傳毒率，而再 20 天及 40 天番茄生育期，植株罹病及病徵表現有一致性，而植株生育期 60 天，病徵表現低於罹病率。

關鍵詞：番茄黃化捲葉病毒、銀葉粉蝨、聚合酶連鎖反應

接受日期：2006 年 11 月 13 日

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 94 年栽培面積達 2118 公頃，

1. 行政院農業委員會台南區農業改良場研究報告第 327 號。

2. 台南區農業改良場助理研究員。台南縣新化鎮牧場 70 號

佔全省栽培面積的 44.5%。番茄的病毒病害主要有：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)、Tomato yellow leaf curl virus(TYLCV)所引起⁽⁷⁾，是番茄主要的病害之一，最早在印度的蕃茄作物上發現⁽¹¹⁾，所造成的損失可高達百分之百⁽⁸⁾。在台灣地區雙生病毒(Geminivirus) 病害首先是 1946 年發現菸草黃化捲葉病毒(Tabacco yellow leaf curl virus)⁽⁸⁾，隨後亦在番茄、甘藷、大青、石薯及藿香薊上發現^(1,2,10)，近期台灣中南部地區，受到番茄捲葉病毒的肆虐^(3,4)，使得番茄幾乎失去收成，番茄捲葉病毒是由銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii* Perring & Bellows)⁽⁵⁾所傳播，單隻銀葉粉蝨傳播率僅 18%，當接種蟲數達 15 隻以上時，其傳播率可達 100%⁽⁹⁾。番茄捲葉病毒寄主範圍非常廣⁽⁶⁾，因此必須積極加以防治，才能減少番茄捲葉病毒的發生。

材料與方法

一、病毒病害與銀葉粉蝨傳毒之關係

(一) 病毒病害的調查-採樣

官田鄉選取一網室一露天番茄栽培田，每一栽培田採集疑似罹病株樣品，番茄捲葉病毒 (Tomato leaf curl virus ; TLCV or Tomato yellow leaf curl virus ; TYLCV) 以專一性引子對進行聚合酶連鎖反應 (PCR) 檢測。共計實驗二期作之番茄。

(二) 專一性引子偵測

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)：

番茄捲葉病毒專一性引子對 (GCP1/GCP2) 由國立中興大學胡仲棋老師提供，GCP1 (+) 序列為 5' ggCATgCCATggCgAAgCgACCCgCCg 3'；GCP-2 (-) 序列為 5' gCgCggATCCTTAATTTTgTATCgAATCATAg 3'，反應溶液 20 μ l 中，包括 1 μ l 引子 (+) 及 (-) 0.5mM dNTPs，2.5mM MgCl² 及 0.5 μ l Tag DNA 聚合酶。於 HYBAID 熱循環反應儀 (PCR EXPRESS HYBAID)，設定反應時間如下：94 $^{\circ}$ C，5 分鐘；維持 80 $^{\circ}$ C 加入 Tag DNA 聚合酶，94 $^{\circ}$ C，3 分鐘、45 $^{\circ}$ C，5 分鐘、72 $^{\circ}$ C，5 分鐘，一個循環後；94 $^{\circ}$ C，1 分鐘、50 $^{\circ}$ C，1 分鐘、72 $^{\circ}$ C，分鐘，30 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C，5 分鐘進行一個循環後維持在 25 $^{\circ}$ C。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。

(三) 銀葉粉蝨帶毒率調查

尚未栽種時採集田邊雜草上之銀葉粉蝨 10 隻，每一栽培田採集銀葉粉蝨 10 隻單隻銀葉粉蝨總量 DNA 的抽取利用 Genomic DNA purification Kit (GeneMark Technology Co.; Taiwan)，於 binding DNA 時加入 15 μ l 的 Resin，可以純化到更多的銀葉粉蝨 DNA，總

體積為 5 µl，取 1 µl 進行 PCR，方法同番茄樣本分析。

(四) 銀葉粉蝨族群變動調查

銀葉粉蝨的族群密度偵測以黃色黏紙調查，於植株頂端不超過 30 cm 的地方設置黏紙 (215mm×150mm)，每園區每種顏色黏紙各設置六張，每 7 天更換一次，以塑膠膜覆蓋於黏紙上，攜回實驗室計算誘得蟲數。

二、銀葉粉蝨傳播番茄捲葉病毒之研究

(一) 無毒銀葉粉蝨的飼養

於田間採集銀葉粉蝨，先飼養於聖誕紅上，連續數世代，再移至於健康之番茄植株上飼養，此番茄植株為“西施”品系，種子購自生生種苗公司培育而來，觀察紀錄兩個月，無任何病徵出現，並取樣以 PCR 檢測確實為無病毒銀葉粉蝨後，再移回聖誕紅植株上，大量繁殖。

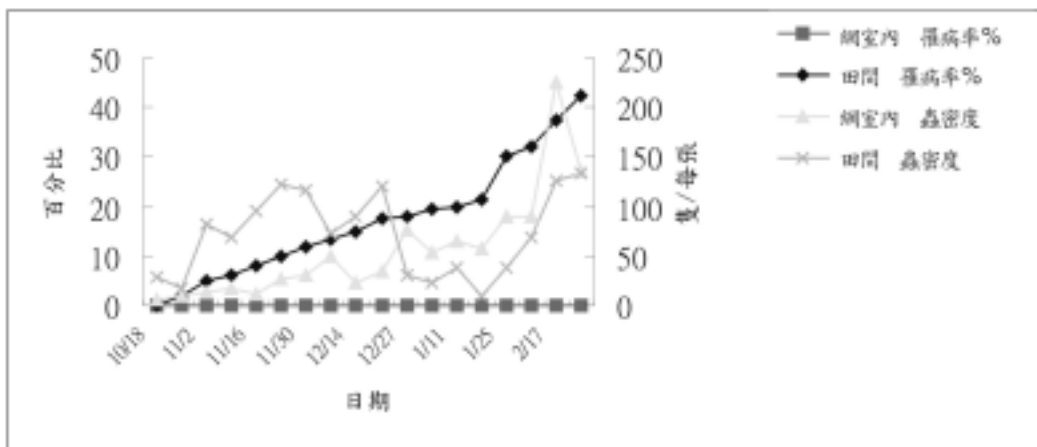
(二) 銀葉粉蝨傳毒試驗

供試蟲源取自無毒的銀葉粉蝨，先置於罹患番茄捲葉病毒植株上吸食 48 小時，使其獲毒。取播種後 20、40 及 60 天之番茄植株 (台南場之金艷品種)，分別接種帶黃化捲葉病毒之銀葉粉蝨 5、10、15 隻，各處理接種 9 株，接種 48 小時後移除銀葉粉蝨，以 PCR 檢測植株罹病及觀察發病情形。方法同番茄樣本分析。

結果與討論

一、病毒病害與銀葉粉蝨傳毒之關係

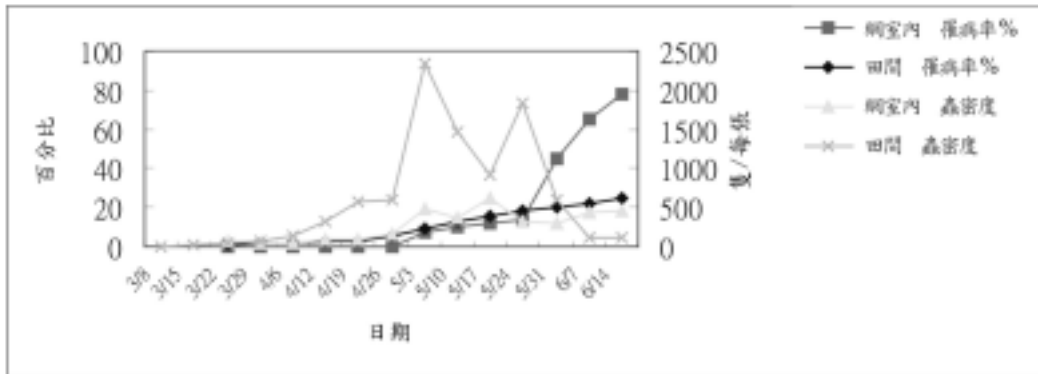
官田鄉選取一網室一露天番茄栽培田共計實驗兩次，冬作番茄田銀葉粉蝨族群消長及番茄捲葉病毒罹病率如圖一。網室內罹病度為 0.1%，銀葉粉蝨帶毒率為 10%，銀葉粉蝨密度為 89.2 隻/每張；田間罹病度為 42.2%，銀葉粉蝨帶毒率為 100%，銀葉粉蝨密度為 68 隻/每張。由於氣候較寒冷，網室內的溫度相較較露天栽培為高，所以網室內的蟲口數反而較高，可能因為番茄植株已至生長後期，植株健壯，抗病性較高，網室內的罹病度並沒有隨之增高。



圖一：93 年冬作番茄銀葉粉蝨族群密度消長及番茄捲葉病毒罹病率情形

Fig. 1. The whitefly population dynamic and the infection rate of tomato leaf curl virus in tomato field in winter crop at 2004

春作番茄於三月初開始種植，種植前網室內銀葉粉蝨密度為 76 隻/每張，帶毒率為 20%，田間雜草上零星幾隻，帶毒率為 50%，種植後至六月初調查如圖二，網室內罹病度為 65%，銀葉粉蝨帶毒率為 70%，銀葉粉蝨密度為 303.3 隻/每張；田間罹病度為 22%，銀葉粉蝨帶毒率為 50%，銀葉粉蝨密度為 591 隻/每張。網室內若是蟲口密度高，三個星期後就可陸續看到罹病株，且隨著蟲口密度增高罹病株數隨之增高。

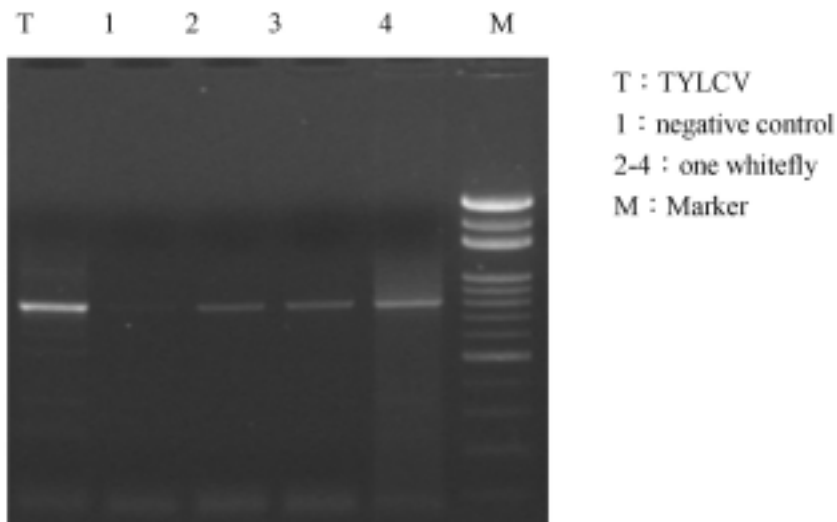


圖二：94 年春作番茄銀葉粉蝨族群密度消長及番茄捲葉病毒罹病率情形

Fig. 2. The whitefly population dynamic and the infection rate of tomato leaf curl virus in tomato field in spring crop at 2005

銀葉粉蝨帶毒率調查

是以單隻銀葉粉蝨抽取 DNA 進行 PCR，可檢測到銀葉粉蝨是否帶毒，如圖三。



圖三：單隻銀葉粉蝨攜帶黃化捲葉病毒之 PCR 偵測

Fig. 3. Detection of TYLCV in one whitefly by polymerase chain reaction

二、銀葉粉蝨傳播番茄捲葉病毒之研究

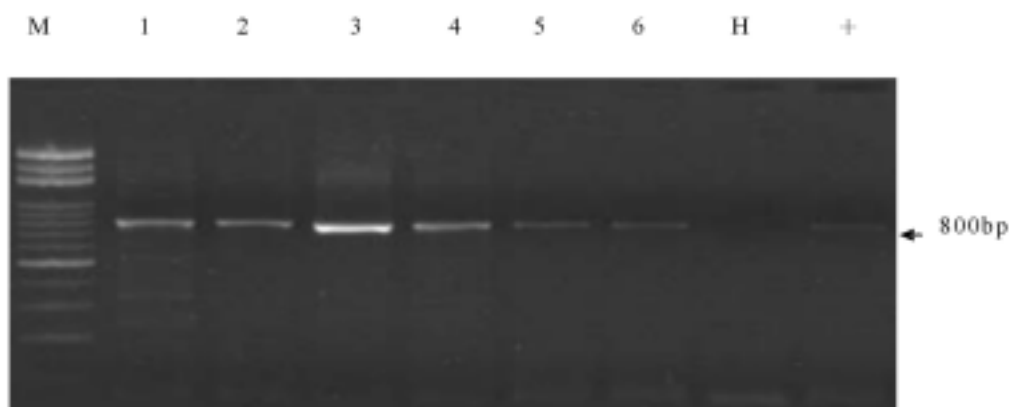
取播種後 20、40 及 60 天之番茄植株，分別接種帶黃化捲葉病毒之銀葉粉蝨 5、10、15 隻，各處理接種 9 株，接種 48 小時後移除銀葉粉蝨，以 PCR 檢測植株罹病及觀察發病情形，重複三次，平均結果如下（表一）。

表 1. 銀葉粉蝨傳播番茄捲葉病毒試驗

Table 1. Transmission test of TYLCV by whitefly.

| 植株生育期 | 20 天 | | | 40 天 | | | 60 天 | | |
|----------|------|----|-----|------|-----|-----|------|----|----|
| | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 |
| 接種蟲數(隻) | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 |
| 植株病毒檢出率% | 56 | 96 | 100 | 70 | 100 | 100 | 63 | 89 | 96 |
| 植株罹病率% | 56 | 96 | 100 | 70 | 100 | 100 | 59 | 85 | 78 |

植物葉片經由簡易 DNA 的抽取後，進行聚合酶連鎖反應（PCR）檢測植株病毒（圖四）。



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

圖四：PCR 檢測銀葉粉蝨接種番茄捲葉病毒後，植物帶毒情形

Fig.4. Detection of TYLCV by polymerase chain reaction after whitefly transmitted

由結果可知，在植株生育的不同時期，以五隻銀葉粉蝨接種番茄捲葉病毒，無法達到百分之百的接種率，所以至少需要 10 隻以上銀葉粉蝨才能達到，植株生育初期及中期罹病情形與植株偵測到的病毒率相符合，但是後期（60 天以後），植株偵測得到病毒，但是植株不一定表現出罹病情形，筆者另有偵測番茄生育 78 天接種情形，接種 15 隻銀葉粉蝨，植株番茄捲葉病毒檢出率 90%，但是罹病毒率卻只有 33.3%。

這與田間調查到的情形相符，即是番茄生育後期若是田間銀葉粉蝨密度高，因為植株較健壯，較不易得病。所以農民要防治番茄捲葉病毒，在番茄生育初期，不論是種植在田間或是溫網室，都一定要做好銀葉粉蝨的防治。

引用文獻

1. 梁耀光、楊佐琦、柯南靖. 1990. 台灣 Geminiviruses 之發生及診斷. 植保會刊 32:136-144.
2. 陳信宏. 1996. 銀葉粉蝨傳播番茄捲葉病毒之研究. 國立中興大學昆蟲研究所碩士論文.
3. 彭瑞菊、鄭安秀. 2002. 番茄捲葉病毒之偵測. 台南區農業專訊 42:18~20
4. 彭瑞菊、鄭安秀. 2003. 台南區番茄病毒病的種類及分佈. 台南區農業專訊 44:15~18
5. Bethke, J. A., Paine, T. D., and Nuessly, G. S. 1991. Comparative biology, morphometries, and development of two populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton and poinsettia. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 84:407-411.
6. Byrne, D. N., and Miller, W. B. 1990. Carbohydrate and amino acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. *J. Insect Physiol.* 36:433-439.
7. Czosnek, H., Ber, R., Antignus, Y., Cohen, S., Navot, N. and Zamir, D. 1988. Isolation of tomato yellow leaf curl virus, a geminivirus. *Phytopathology* 78:505-512.
8. Matsumoto, T. 1946. Tobacco disease in Formosa. *Mem Fac. Agric. Taiwan Univ.* 1:1-26.
9. Moustafa, S. E. S. and Nakhla, M. K. 1990. An attempt to develop a new tomato variety resistant to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Ass. J. Agric. Sci.* 21:167-183.
10. Tsai, M. C., Liu, C. S. and Su, H. J. 1997. Poinsettia leaf curl, a new disease caused by a geminivirus. *J. Phytopathology* 145:347-350.
11. Vasudeva, R. S. and Sam Raj, J. 1948. A leaf curl disease of tomato. *Phytopathology*

38:364-369.

Monitoring of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in the Field and the Transmission of Virus by Whitefly¹

Peng, J. C. and S. K. Chen²

Summary

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is a serious disease in tomato field, causing symptoms of leaf yellowing, leaf-curling, and severe reduction of Tomato yield. The TYLCV is a whitefly-transmitted geminiviruses. We try to study the relationship between infection rate and whitefly transmission. The DNA fragments from whiteflies and tomato leaves could be amplified by polymerase chain reaction to detect the infection rate. In winter crops in the green house, the infection rate of plants was 0.1%, and the infection of whitefly was 10%, the insect population density was 89.2 individual on a stick-paper. In the field, the infection rate was 42.2% on plants, and 100% of whiteflies were infected, the insect population was 68 individual on a stick-paper. In the green house the temperature was cooler and the insect number increased, but infection rate was not increased in tomato plant. In spring crops in the green house, the infection rate of plants was 65%, the 70% of whiteflies were infected, the insect population density was 303.3 individual on a stick-paper. In the field, the infection rate was 22% on plants and 50% of whiteflies were infected, the insect population density was 591 individual on a stick-paper. The insect population density increased and the virus infected plants were observed after three weeks. The TYLCV injured were seriously in the field than in the green house. The infection rate of TYLCV is positively related to the population of silver leaf whitefly (*Bemisia argentifolii*). Different tomato growth periods were used to test the transmission of tomato yellow leaf curl virus by whitefly. Plants of 40 days were transmitted easily than that of 20 days. It seems that plants at 60 days or older are resistant to infection or transmission of the virus.

Key word: tomato yellow leaf curl virus (TYLCV); Whitefly ; polymerase chain reaction (PCR)

Accepted for publication: 13 November, 2006

1. Contribution No. 327 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, the Executive Yuan.

2. Assistant Researcher, Tainan District Agricultural Research and Extension Station. 70 Muchang, Sin-hua, Tainan 712, Taiwan, R. O. C.