

中部地區麻竹病蟲害調查與田間無病毒植株篩選技術

趙佳鴻、戴振洋、王妃蟬、林大淵、沈原民、白桂芳

摘 要

2010年9~12月在3個中部麻竹筍產區(大坑、太平及草屯)，進行7種主要病蟲害調查，其中蟲害以盲椿象(*Mecistoscelis scirtetoides*)最為常見，危害度最高；病害以銹病(*Dasturelle divina*)最為常見。在此3地區調查結果顯示竹嵌紋病(*Bamboo mosaic virus; BaMV*)罹病率最高地區可達38%，最低地區亦有25%，且因農友缺乏防範病毒病害之觀念，造成竹嵌紋病有愈來愈嚴重之趨勢。防除麻竹嵌紋病主要有3個工作項目，(1)純化病毒製備*BaMV*抗血清純化以酵素結合抗體檢定法(ELISA)，篩選健康麻竹，進行高壓繁殖株。(2)高壓繁殖之麻竹苗經ELISA檢定確認無感染*BaMV*，再設置母本保存圃及繁殖圃。(3)繁殖圃植株開始高壓繁殖，設置無病毒麻竹苗圃，高壓繁殖麻竹苗亦經ELISA檢定法確認無感染*BaMV*。為提高偵測麻竹植株罹染竹嵌紋病毒(*BaMV*)之準確度，研發利用細菌載體(pET28b)系統大量表現*BaMV*鞘蛋白，製備抗血清及巢式聚合酵素鏈鎖反應(Nested PCR)，供無病毒麻竹苗圃及母本圃定期檢測用。

內 容

2010年9~12月在3個中部麻竹筍產區(大坑、太平及草屯)，進行病蟲害調查，包括嵌紋病(*Bamboo mosaic virus; BaMV*)、銹病(*Dasturelle divina*)、白絹病(*Athelia rolfsii*)、煤病(*Scorias communis*)、竹葉扁蚜(*Astegopteryx bambusifoliae*)、盲椿象(*Mecistoscelis scirtetoides*)、粗腳飛蝨(*Purohita cervina*)等7種主要病蟲害；調查方式植株發病率=(染病株數/調查總株數)×100%，植株發病指數或害蟲危害度則先確定好病害及蟲害危害之級數標準，調查時根據病蟲害危害分級標準確定各被調查植

株的危害程度，最後依 $\sum(\text{各級病株數} \times \text{相應級數}) / \text{調查總株數} \times \text{最高級值} \times 100\%$ 公式計算出病害發生指數或蟲害危害度。調查結果顯示蟲害以盲椿象最為常見，危害度最高；其次為粗腳飛蝨，竹葉扁蚜危害較輕。病害以銹病最為常見，其次為嵌紋病及煤病，而白絹病則僅在缺乏田間管理之調查點零星發生。在此3地區調查結果顯示竹嵌紋病罹病率最高地區可達38%，最低地區亦有25%，且因農友缺乏防範病毒病害之觀念，造成竹嵌紋病有愈來愈嚴重之趨勢。

麻竹嵌紋病(*BaMV*)，其病毒傳播主要靠操作耕作或採收器具之機械方式傳播，目前並無媒介昆蟲可傳播此病毒之報導，因此若能種植無病毒之竹苗全面更新筍園，及加強耕作或採收器具工具之清潔消毒作業應可達到防除此病害的目的。防除麻竹嵌紋病毒危害主要有3個工作項目，(1)首先自2010年起利用目測並配合利用藜藜(*Chenopodium quinoa*)葉片純化病毒，製備具專一性*BaMV*抗血清以間接酵素結合免疫吸附分析法(Indirect-ELISA)，從15處筍園500植株篩選健康麻竹150株，進行高壓繁殖。(2)高壓繁殖之無病毒麻竹苗經3次ELISA檢定法確認無感染*BaMV* 136株麻竹苗於大坑地區另設置母本保存圃1處及示範繁殖圃2處，開始進行利用無病毒麻竹苗示範推廣工作。(3)麻竹繁殖圃自2012年開始高壓繁殖，設置無病毒麻竹苗圃，2012年高壓繁殖麻竹苗亦經3次ELISA檢定法確認無感染*BaMV*有100株作為更新母本圃及新增繁殖圃2處之用。今年檢定高壓繁殖發根成功無病毒苗目前統計有250株。

純化病毒製備*BaMV*抗血清以酵素結合抗體檢定法(ELISA)，田間98個樣品以*BaMV*血清稀釋3000倍檢測，在標準測試時間內(呈色30分鐘)，罹病(正對照)樣品已經呈現病毒反應(讀值約2.2~2.9)，而受測98個樣本之測試結果：其中有13個樣品測到病毒(13.27%)，但仍有26個樣品呈現疑似反應(26.53%)，呈現疑似反應的樣本可能屬於初期感染，亦有可能屬於偽陽性，因此該樣本宜重新檢驗或利用高靈敏性的方式檢測，因為病毒如果蟄伏於植物體中或病毒含量低時，此技術則難以在早期檢出之缺點，因此為利於母本圃病毒檢測之工作亦配合利用準確度高之核酸專一性檢測(RT-PCR)。為了更提高ELISA及RT-PCR偵測*BaMV*之精確度，方法是將

*BaMV*病毒鞘蛋白基因以限制酶切割後，再以DNA ligation kit粘接至pET28b (+)載體，轉殖於DH5 α 菌株，並於*Escherichia coli* BL21 (DE3)菌株表現蛋白。經電泳分析該表現蛋白之分子量約為6.1 kDa。經注射白兔製備抗血清，以ELISA分析顯示自製的抗體與病毒鞘蛋白基因表現蛋白及侵染麻竹植株的病毒鞘蛋白有同源(homologous)反應，因此利用病毒鞘蛋白基因的表現蛋白所製備的抗體可作檢測之用。另利用NCBI gene bank資料中之不同*BaMV*分離株鞘蛋白基因設計出2組引子對進行Nest PCR測試，結果顯示利用大坑麻竹無病毒繁殖圃高壓繁殖的131株無病毒麻竹苗進行RT-PCR及Nest-PCR，RT-PCR檢測結果在*BaMV* 病毒檢測中，131個樣品中有3個樣品測到病毒(占2.29%)，而Nest-PCR檢測結果在*BaMV*病毒的檢測中，有37個樣品測到病毒(占28.24%)。

結 語

pET蛋白表現系統是在大腸桿菌(*E. coli*)中進行選殖和表現重組基因蛋白系統中最強有力的一套系統。檢測結果顯示以此蛋白表現系統表現*BaMV*病毒鞘蛋白所製備之*BaMV*抗血清以酵素結合抗體檢定法(ELISA)，田間3個樣品以*BaMV*血清稀釋2,000~10,000倍檢測，在標準測試時間內(呈色40分鐘)，罹病(正對照)樣品已經呈現病毒反應(讀值約1.55~3.34)，而受測3個無染病毒麻竹樣本之測試結果(讀值僅約0.087~0.198)，結果顯示純化病毒所製備之*BaMV*血清ELISA試驗的背景值明顯的較高，這對於微量病毒的判定十分不易，因為可能微量病毒的讀值僅僅高於負對照之2倍，造成無法釐清這些偏高的讀值是微量病毒存在還是血清本身的背景值干擾。如此造成漏檢或者誤判之可能性偏高也增加判讀的困難。

巢式PCR(Nest PCR)是專一性更高的聚合酶鏈反應(PCR)，原理是使用兩對PCR引子擴增特定的核酸片段。第一對PCR引子擴增核酸片段和PCR相似。而第二對引子稱為巢式引子(因為他們在第一次PCR擴增核酸片段的內部)因結合在第一次PCR產物內部，使得第二次PCR擴增核酸片段短於第一次擴增的。巢式PCR的好處，如果第一次擴增產生了錯誤核酸片斷，則第二次能在錯誤片段上再進行引子

配對並擴增出特定核酸片段的概率極低。因此，巢式PCR的特定核酸擴增技術比PCR技術更具專一性。實驗結果顯示定期針對繁殖的母本做RT-PCR及Nest PCR兩種技術監測BaMV病毒發生情形，應可減少麻竹苗帶病毒的比例，以減少損失。以上2種技術之運用可供無病毒麻竹苗圃及母本圃定期檢測用，並提高偵測麻竹植株罹染竹嵌紋病毒(BaMV)之準確度。

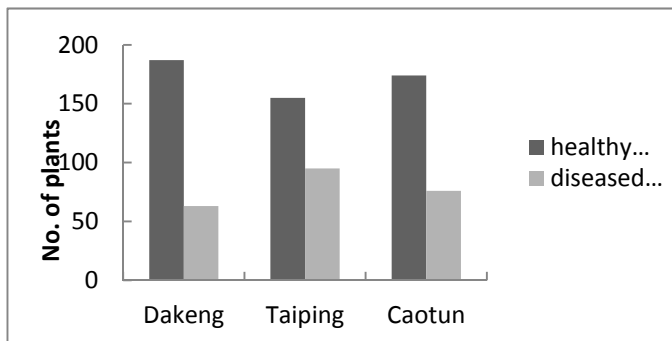


圖 1. 2010 年 9~10 月，3 個中部麻竹筍生產地區(大坑、太平、草屯)竹嵌紋病毒罹病調查。

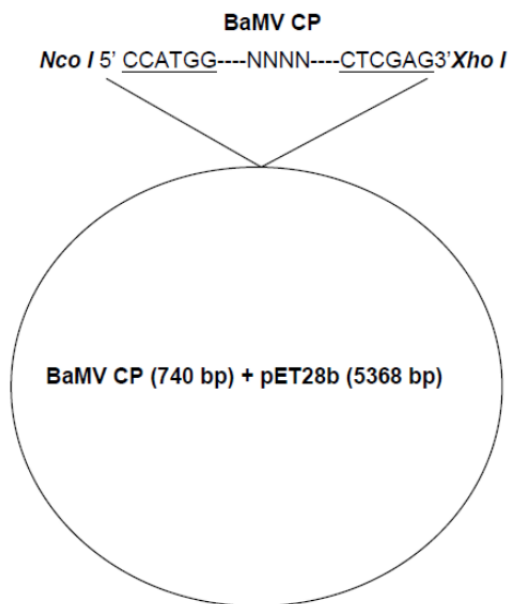


圖 2. pET28b 蛋白表現系統嵌入 BaMV 病毒鞘蛋白基因之構築。

表 1. 以 pET 蛋白表現系統表現之 *BaMV* 病毒鞘蛋白所製備之 *BaMV* 抗血清 (RB2025)與純化病毒所製備之 *BaMV* 抗血清(RAS-BaMV)以酵素結合抗體檢定法(ELISA)效果試驗。

| 測試血清 | 病株-1 | 病株-2 | BaMV-CP (1ng) | 健株-1 | 健株-2 | 健株-3 | 健株-4 |
|----------------|-------|-------|------------------|-------|-------|-------|-------|
| RB2025-2000X | 3.339 | 3.070 | 3.430 | 0.140 | 0.192 | 0.198 | 0.287 |
| RB2025-4000X | 3.058 | 2.587 | 3.441 | 0.109 | 0.136 | 0.147 | 0.240 |
| RB2025-8000X | 2.314 | 1.770 | 3.306 | 0.092 | 0.106 | 0.110 | 0.182 |
| RB2025-10000X | 2.114 | 1.555 | 3.106 | 0.087 | 0.098 | 0.105 | 0.166 |
| RAS-BaMV 1000X | 3.380 | 3.251 | 3.363 | 0.894 | 1.061 | 1.216 | 2.791 |
| RAS-BaMV 2000X | 3.372 | 3.258 | 3.391 | 0.619 | 0.739 | 0.834 | 2.541 |

表 2. 利用 RT-PCR 及 Nest-PCR 技術偵測田間無病毒植株高壓繁殖之麻竹苗試驗

| No. | 試驗編號 | <i>BaMV</i> | | |
|-----|----------------------|-------------|----------|---|
| | | RT-PCR | Nest-PCR | |
| 1 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B004-7-2 | - | + |
| 2 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B004-9-5 | - | + |
| 3 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B004-10-6 | - | + |
| 4 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B005-1-2 | - | - |
| 5 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B005-1-3 | - | + |
| 6 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B005-5-1 | - | + |
| 7 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B005-5-2 | - | - |
| 8 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B005-6-2 | - | + |
| 9 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B007-7-1 | - | + |
| 10 | 麻竹筍-平地示範田 1 區-1 行健康區 | B007-7-5 | - | - |

參考文獻

1. 鄭安秀、葉忠川 2002 無嵌紋病毒綠竹苗繁殖體系之建立與推廣 植物病理學會刊 11(4): 169-172.1.
2. 鄭安秀、方新政、陳文雄、謝元德 2002 無嵌紋病綠竹的栽培及病蟲害管理 臺南區農業改良場技術專刊 91-2 (No.120). 2.

3. 鄭安秀、方新政、陳文雄、謝元德 2002 無嵌紋病綠竹的栽培及蟲害管理 臺南區農改場技術專刊 120: 1-12。
4. Antonio O., E.Bertolini and M. Cambra. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods* 106(1): 51-59
5. Boltovets, P. M., Boyko, V. R., Kostikov, I. Y., Dyachenko, N. S., Snopok, B. A., and Shirshov, Y. M. 2002. Simple method for plant virus detection: effect of antibody immobilization technique. *J. Virol. Methods* 105: 141-146.
6. Cupertino, F. P. and Costa, C.L. (1977) Partial purification and some properties of bamboo mosaic virus. *Phytopathology* 67: 1439-1443.
7. Hseu, S. H.; Sung, C. J.; Gao, R. L.; Chen, B. S.; Lin, C. Y.2008. Occurrence of leaf blight of turmeric caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in Taiwan.. *Plant Pathology Bulletin* 17(1): 43-52
8. Lin, N. S. and Chen, C. C.(1991) Association of Bamboo moaic virus (BaMV) and BaMV-specific electron dense crystalline bodies with chloroplasts. *Phytopathology* 81: 1551-1555
9. Lin, N. S. and Chen, C. C.(1991) Association of Bamboo moaic virus (BaMV) and BaMV-specific electron dense crystalline bodies with chloroplasts. *Phytopathology* 81: 1551-1555.9.
10. Lin, Y. H. 2003. The MP and 2b genes of Cucumber mosaic virus complement the mutated potyviral HC-Pro gene defective in hypersensitive reaction and virulence. Master Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University.