

臺灣感染番茄的begomoviruses不同年度 發生狀況及病原性

沈原民

摘 要

本次專題討論的主角是 begomoviruses，他們是具有單股環狀的 DNA 的病毒，許多 begomovirus 具有 DNA A 及 DNA B，或僅有 DNA A。Temporal distribution and pathogenicity of the predominant tomato-infecting begomoviruses in Taiwan 這份研究報告累積 1998 年至 2009 年偵測感染番茄的 begomoviruses，分析這類病毒在臺灣時間序列上的變化，共偵測到四種病毒，分別是 *Tomato leaf curl Hsinchu virus* (ToLCHsV)、*Ageratum yellow vein Hualien virus* (AYVHuV)、*Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV)、*Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV)，ToLCHsV 在 2000 年發現，AYVHuV 在 2003 年發現，AYVHuV-Hsi 被認為是一個新的病毒 strain，比較 AYVHuV-Hsi 與其他病毒的序列，推測 AYVHuV-Hsi 是 ToLCTWV 與 AYVHuV-Hua 重組的 recombinant。ToLCTWV 序列分析結果可分作 3 個 strains，ToLCTWV strain A 為全島分布、ToLCTWV strain B 分布在東台灣、ToLCTWV strain C 分布在西台灣。此研究中調查臺灣主要感染番茄的 begomoviruses 是 ToLCTWV 及 TYLCTHV，2005 年，TYLCTHV 單獨感染番茄的比率占所有受測樣本約 1%，至 2007 年為 29%，到了 2008~2009 為 51%；而番茄受 ToLCTWV 感染的比率從 2005 年為 99%，到 2007 年為 29%、2008~2009 為 8%；受 TYLCTHV 及 ToLCTWV 複合感染的比率在 2007 年為 42%、2008~2009 年為 41%。由此可得知在臺灣主要感染番茄的 begomoviruses 從過去主要為 ToLCTWV，到後來主要為 TYLCTHV，或 TYLCTHV 及 ToLCTWV 複合感染。作者發展 ToLCTWV 及 TYLCTHV 的 infectious clones 作接種測試，接種 ToLCTWV infectious clone 的番茄與菸草全數出現病徵，單獨接種 TYLCTHV DNA A infectious clone 或同時接種 TYLCTHV DNA A 及 TYLCTHV DNA B infectious clone 的番茄與菸草也全數出現病徵。為了測試接種病毒 infectious clones 感染番茄產生病徵後的傳染力，以粉蝨

傳播法和機械接種法實驗，實驗結果呈現粉蝨可傳播 ToLCTWV、TYLCTHV DNA A 加上 DNA B、與只有 TYLCTHV DNA A 的 infectious constructs 到健康的番茄上；機械接種實驗中，同時含有 DNA A 加上 DNA B 的 TYLCTHV 可被機械傳播至番茄與菸草植株，但只含 TYLCTHV 的 DNA A、還有 ToLCTWV 無法機械傳播至番茄與菸草上。

前 言

過去，我在本場專題討論中皆整合多篇報告為一個主題，但本次將針對一篇報告，與同仁深入分享報告的架構與內容。本文將以亞蔬-世界蔬菜中心及中興大學研究人員發表的：Temporal distribution and pathogenicity of the predominant tomato-infecting begomoviruses in Taiwan 一文作為專題討論的主題。

番茄，是在臺灣及世界上重要的蔬菜，但感染番茄的病毒是番茄生產的限制因子之一，有多種感染番茄的病毒由粉蝨傳播，可引起葉片捲曲、黃化等病徵，屬於 Geminiviridae 科下的 begomovirus。這一類的病毒具有單股環狀的 DNA，而許多 begomovirus 具有 bipartite genome (代表 genome 分作兩個片段：DNA A 及 DNA B，包覆在分開的顆粒中)，或者僅為 monopartite genome (只有 DNA A)。區別不同種類的 begomovirus，可從是否存在 DNA B，或是比較 DNA A 序列的差異著手：例如 Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) 只具有 DNA A，而 Tomato yellow leaf curl Thailand virus (TYLCTHV) 具有 DNA A 及 DNA B；比較 DNA A 的全長序列，當分離株之間的序列相同度大於 89%，可作為是同一種 species 的指標。

研究報告中累積 1998 年至 2009 年偵測感染番茄的 begomoviruses，分析這類病毒在臺灣空間的差異及時間序列上的變化，此外，也證明病毒的 DNA 序列可感染番茄。

內 容

一、調查及偵測

作者自 1998 年起在臺灣不同區域採集有捲葉、或疑似受 begomoviruses 感染的番茄樣本，從剛開始較少數的樣本，至 2003 年起，於臺灣北、中、南、東等區域有系統的採大量具有病徵的樣本作病毒偵測。利用引子對 PAL1v1978B/

PAR1c715H (General DNA-A detection of begomoviruses, amplicon~1.5 kb) 增幅 begomoviruses 的 DNA A；以及引子對 DNABLC1/DNABLV2 及 DNABLC2/DNABLV2 (General DNA-B detection of begomoviruses, amplicon~2.5kb) 確認樣本內是否可增幅出 begomoviruses 的 DNA B。解序比對初步確認目標病毒的種類後，再與其他專一性引子對增幅，整理出病毒的全長序列，並作序列分析。

1998 年至 2004 年間，在採得的樣本以專一性引子對並未偵測出 TYLCTHV；而在前述時間內，所有偵測到 begomovirus 的樣本內除少數樣本外皆有偵測到 *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV)，例外的是 2000 年採到的 CT1 樣本，後續鑑定為 *Tomato leaf curl Hsinchu virus* (ToLCHsV)，以及 2003 年採到的 HS7 樣本，後續鑑定為 *Ageratum yellow vein Hualien virus* (AYVHuV)。除了上述兩特例樣本外，從其他樣本亦偵測到 ToLCHsV、AYVHuV，但這些樣本上也同時偵測到 ToLCTWV，呈現可能複合感染兩種病毒在同一個樣本的現象。

二、序列分析

作者分離到的 AYVHuV 其序列與其他已知的 AYVHuV 其序列相同度為 90.5~91.3%，根據 Fauquet 等人對 begomoviruses 認定的原則，DNA A 全長序列相同度在 85~94% 之間可認定為「strain」之間的比較，因此作者將 HS7 樣本認定為一個新的病毒 strain：AYVHuV-Hsi。從這個樣本的序列組成，作者推測可能與病毒之間的重組有關，這個 recombination region 有 607bp，這個區域的序列與一株 ToLCTWV 有 92.8% 的序列相同度，而其他的序列則與一株 AYVHuV 的 strain：AYVHuV-Hua 有 98.4% 的序列相同度，因此 AYVHuV-Hsi 推測是 ToLCTWV 與 AYVHuV-Hua 重組的 recombinant。

作者在 2007 年的調查中，取得 23 個 ToLCTWV 的全長序列(另有 8 條 ToLCTWV 序列在 1998~2004 年取得)、20 個 TYLCTHV 的病毒 DNA A 全長序列，加上 ToLCHsV、AYVHuV 及 NCBI 資料庫的相關序列，利用 Clustal W alignment 及 neighbour-joining method 產生演化樹狀圖。由取得的序列相互比較，作者將 ToLCTWV 分為 3 個 strains，分別為 strain A、strain B、strain C，部份未解全長序列的樣本也可以從 PAL1v1978B/ PAR1c715H 增幅出的 1.5 kb amplicons 推測樣本所屬的 strain。追溯樣本來源，ToLCTWV strain A 為全島分布、ToLCTWV strain B 分布在東台灣、ToLCTWV strain C 分布在西台灣。

另外，有 6 條 TYLCTHV 的 DNA B 全長序列被解序出來，6 條序列之間的序列相同度在 99.0~99.5% 之間，但這些序列與泰國當地的 TYLCTHV 之 DNA B 序列相同度僅 86.5-86.8%。

三、在臺灣不同年度的 ToLCTWV 及 TYLCTHV 之發生狀況

2005 年，TYLCTHV 單獨感染番茄的比率占有受測樣本約 1%，至 2007 年為 29%，到了 2008~2009 為 51%；而番茄受 ToLCTWV 感染的比率從 2005 年為 99%，到 2007 年為 29%、2008~2009 為 8%；受 TYLCTHV 及 ToLCTWV 複合感染的比率在 2007 年為 42%、2008~2009 年為 41%。由此可得知在臺灣主要感染番茄的 begomoviruses 從過去主要為 ToLCTWV，到後來主要為 TYLCTHV，或 TYLCTHV 及 ToLCTWV 複合感染。作者推測此現象可能與 2003 年後引進對番茄黃化捲葉病的抗性基因 *Ty-2* 之番茄品種有關，或可能 TYLCTHV 比 ToLCTWV 有對番茄更高的感染能力、或更適合被媒介粉蝨傳播。

四、農桿菌接種病毒 infectious DNAs

此研究中選擇主要感染番茄的病毒：ToLCTWV 及 TYLCTHV，發展 infectious clone 作後續測試。ToLCTWV 病毒全長 DNA、TYLCTHV 的 DNA A、TYLCTHV 的 DNA B 被作成 infectious construct，各別轉到農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 表現，再接種到番茄與菸草上，觀察產生病毒病徵的狀況。

接種 ToLCTWV infectious clone 的番茄與菸草全數出現病徵，單獨接種 TYLCTHV DNA A infectious clone 或同時接種 TYLCTHV DNA A 及 TYLCTHV DNA B infectious clone 的番茄與菸草也全數出現病徵。接種 ToLCTWV infectious clone 的植株及接種 TYLCTHV DNA A、DNA B 的植株在番茄上約 4 週產生病徵，在菸草上約 2 週產生病徵；但單獨接種 TYLCTHV DNA A 的番茄與菸草植株發病皆較同時接種 TYLCTHV DNA A、DNA B 的植株延遲 1 週出現病徵；單獨接種 TYLCTHV DNA B 的植株及對照組皆未出現病徵。

五、infectious DNAs 後代機械接種及粉蝨傳播測試

為了測試農桿菌接種病毒 infectious DNAs 感染番茄產生病徵後的傳染力，以粉蝨傳播法和機械接種法實驗。粉蝨傳播法讓 200 隻健康粉蝨與一株受感染的番茄放在一起 24 小時獲得病毒，將受感染的番茄植株移除後再放入 12 株健康番茄，

8 週後觀察病徵並以 PCR 偵測。機械接種法取 0.2g 農桿菌接種後受感染的植株葉片，與 1 ml 的 phosphate buffer 混合，與金鋼砂一起在健康植物葉片上磨擦，接種在番茄及菸草兩種作物上。

實驗結果呈現粉蝨可傳播 ToLCTWV、TYLCTHV DNA A 加上 DNA B、與只有 TYLCTHV DNA A 的 infectious constructs 到健康的番茄上，前兩者在接種後 2 週即出現病徵，粉蝨傳播 TYLCTHV DNA A 的 infectious constructs 則比同時含有 DNA A、DNA B 的接種組延遲一週出現病徵。機械接種實驗中，發現同時含有 DNA A、DNA B 的 TYLCTHV infectious clones 可被機械傳播至番茄與菸草植株，試驗也發現受 TYLCTHV 感染的植物(自然含有 DNA A、DNA B)也可以機械傳播至番茄與菸草上；但只含 TYLCTHV DNA A 的 infectious clone、ToLCTWV 的 infectious clones、及自然界受 ToLCTWV 感染的植物則無法機械傳播至番茄與菸草上。

由此可知 ToLCTWV (只有 DNA A)在試驗中能以粉蝨傳播，但無法機械傳播。TYLCTHV (含 DNA A、DNA B)可以粉蝨傳播與機械傳播，但如缺少 DNA B 時，粉蝨傳播感染會被延遲、缺少 DNA B 時無法以機械傳播，這些試驗結果能與過去的文獻相互印證與討論。

結 語

在這篇報告中，我約略學習到作者面對問題的思路：從田間調查病毒病害獲得結果，進一步調查與設計實驗，將資料彙整成爲一篇報告。閱讀完畢後可提出一些問題與心得：(1)報告中追蹤感染番茄的 begomoviruses 至 2009 年，之後是否仍是 TYLCTHV 最爲普遍?另外，除了本文主要調查的 ToLCTWV、TYLCTHV 之外，其他的 begomoviruses，例如 TYLCV，是否感染番茄的比率都像 AYVHuV、ToLCHsV 一樣僅偶然發生而非大量感染?(2)從本文實驗採用不同接種方法結果可知，begomoviruses 在自然界有除了粉蝨外的傳播方式(機械傳播)，如加上 Thakuria 及 Nath 進行 *Tomato leaf curl virus* 的實驗結果，代表一些 begomoviruses 可利用嫁接傳播，包括粉蝨、嫁接、機械傳播都是可能的 begomoviruses 傳播途徑。不同種類的 begomoviruses 有哪幾種可傳播的方式?或哪些方法無法傳播特定病毒?是否與病毒所含有的 DNA A、DNA B 有關?是否有一定的原則可引伸到所有

的 begomoviruses ? (3)本報告中獲得的 TYLCTHV DNA B 與泰國的 TYLCTHV DNA B 序列相同度並不是非常高，我在沒有其他背景知識的狀況下會想：不同病毒種類的 DNA B 相同度和 DNA A 的關係如何？以 infectious clone 的方式，將病毒物種甲的 DNA B 與另一個僅有 DNA A 的病毒物種乙一起接種，是否會加速病毒物種乙的感染或增加可能的傳播方式？以本文的 ToLCTWV 為例，將 ToLCTWV 與 TYLCTHV 的 DNA B 一起接種，是否能使原本無法機械接種的 ToLCTWV 能夠藉由機械接種傳播？

參考文獻

1. Czosnek, H. 2010. Tomato yellow leaf curl virus disease management, molecular biology, breeding for resistance. Springer, the Netherlands.
2. Fauquet, C. M., R. W. Briddon, J. K. Brown, E. Moriones, J. Stanley, M. Zerbini and X. Zhou. 2008. Geminivirus Strain Demarcation and Nomenclature. Arch. Virol. 153: 783-821.
3. Thakuria, B. and P. D. Nath. 2012. Molecular characterization of tomato leaf curl virus of Assam. LAP LAMBERT Academic Publishing, USA.
4. Tsai, W. S., S. L. Shih, L. Kenyon, S. K. Green and F. J. Jan. 2011. Temporal distribution and pathogenicity of the predominant tomato-infecting begomoviruses in Taiwan. Plant Pathol. 60: 787-799.