



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Molecular Detection of Tomato Leaf Curl Taiwan Virus (ToLCTWV) from *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) 【Research report】

煙草粉蝨(半翅目：粉蝨科) 傳播臺灣番茄捲葉病毒之偵測【研究報告】

Fu-Sheng Wu¹, Chia-Hung Hsieh^{1*}, Wen-Bin Yeh², and Chiun-Cheng Ko^{1, 3*}
吳復生¹、謝佳宏^{1*}、葉文斌²、柯俊成^{1,3*}

*通訊作者E-mail: kocc2501@ntu.edu.tw; d93632001@ntu.edu.tw

Received: 2009/09/01 Accepted: 2009/09/30 Available online: 2009/12/01

Abstract

Bemisia tabaci (Gennadius) is an important global agricultural pest. The economic impacts of this pest are primarily due to the damage it inflicts on the health of the host plant health by sucking the plant's juices, by fouling the life cycle of the plant, by secreting honeydew, and by transmitting plant viruses. The most serious damage caused by *B. tabaci* is its transmission of the Tomato leaf curl Taiwan virus (ToLCTWV) to tomato plants in Taiwan. In this study, *B. tabaci* was collected from tomato fields in Taiwan, and the coat protein (CP) gene of the ToLCTWV was isolated from *B. tabaci* by polymerase chain reaction (PCR). Four biotypes of *B. tabaci* have been recorded in Taiwan, and the sequence characterized amplified regions (SCARs) were used to identify the various biotypes. The results revealed that all collected ToLCTWVs were determined to be biotype B of *B. tabaci*. Analyses of the sequence identity, phylogeny, and phylogeography indicated that the ToLCTWV was separated into two variants (a western Taiwan (WTW) variant and an eastern Taiwan (ETW) variant), and that the ETW variant originated from the WTW variant. Phylogenetic relationship within the WTW variant was difficult to discern because of the low genetic variation and its high level of human trade activities. The ETW variant had a higher genetic variance because of its topography, climate, and its low level of human trade activities. The genetic variations suggest that the ETW variant dispersed from the south to north-eastern Taiwan.

摘要

煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) 是一種泛世界性分佈之重要農業害蟲，危害方式是以刺吸式口器攝食植物汁液導致植株衰弱，分泌蜜露誘發煤煙病及傳播植物病毒危害宿主植物。臺灣番茄捲葉病毒 (Tomato leaf curl Taiwan virus, ToLCTWV) 由煙草粉蝨所傳播，並在臺灣地區造成番茄作物的嚴重損失。本研究全面採集臺灣地區番茄作物上的煙草粉蝨，利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅 ToLCTWV 鞘蛋白基因 (coat protein, CP) 來進行偵測及調查其分佈狀態。臺灣地區目前有四型煙草粉蝨生物小種分佈，序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified region, SCAR) 被應用來鑑定生物小種。偵測結果顯示帶有 ToLCTWV 的均為 B 型生物小種。序列相似度、親緣關係及親緣地理分析結果顯示，ToLCTWV 分為臺灣東部與西部兩個變異株 (variant)，東部變異株 (ETW) 源自於西部變異株 (WTW)。西部變異株由於變異小加上人為傳播，使得西部各地的 ToLCTWV 關係難以探討；東部變異株變異大，可能是由於地形、氣候因素及人為干擾小。根據遺傳變異推測東部變異株在東部由南方往北方擴散。

Key words: *Bemisia tabaci*, biotype, Tomato leaf curl Taiwan virus (ToLCTWV), phylogeny, phylogeography

關鍵詞: 煙草粉蝨、生物小種、臺灣番茄捲葉病毒、親緣關係、親緣地理。

Full Text: [PDF \(0.81 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

煙草粉蝨 (半翅目：粉蝨科) 傳播臺灣番茄捲葉病毒之偵測

吳復生¹、謝佳宏^{1*}、葉文斌²、柯俊成^{1,3*}

¹ 國立臺灣大學昆蟲學系 10617 臺北市大安區羅斯福路四段 1 號

² 國立中興大學昆蟲學系 40227 臺中市南區國光路 250 號

³ 國立臺灣大學植物醫學研究中心 10617 臺北市大安區羅斯福路四段 1 號

摘 要

煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) 是一種泛世界性分佈之重要農業害蟲，危害方式是以刺吸式口器攝食植物汁液導致植株衰弱，分泌蜜露誘發煤煙病及傳播植物病毒危害宿主植物。臺灣番茄捲葉病毒 (*Tomato leaf curl Taiwan virus*, ToLCTWV) 由煙草粉蝨所傳播，並在臺灣地區造成番茄作物的嚴重損失。本研究全面採集臺灣地區番茄作物上的煙草粉蝨，利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅 ToLCTWV 鞘蛋白基因 (coat protein, CP) 來進行偵測及調查其分佈狀態。臺灣地區目前有四型煙草粉蝨生物小種分佈，序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified region, SCAR) 被應用來鑑定生物小種。偵測結果顯示帶有 ToLCTWV 的均為 B 型生物小種。序列相似度、親緣關係及親緣地理分析結果顯示，ToLCTWV 分為臺灣東部與西部兩個變異株 (variant)，東部變異株 (ETW) 源自於西部變異株 (WTW)。西部變異株由於變異小加上人為傳播，使得西部各地的 ToLCTWV 關係難以探討；東部變異株變異大，可能是由於地形、氣候因素及人為干擾小。根據遺傳變異推測東部變異株在東部由南方往北方擴散。

關鍵詞：煙草粉蝨、生物小種、臺灣番茄捲葉病毒、親緣關係、親緣地理。

前 言

煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) 在分類上為半翅目 (Hemiptera)，胸喙亞目 (Sternorrhyncha)，粉蝨科 (Aleyrodidae)，

粉蝨亞科 (Aleyrodinae)，伯粉蝨屬 (*Bemisia*) 的昆蟲，廣泛分佈於全球除南極洲之外的亞洲、歐洲、美洲、非洲和大洋洲等許多地區 (Oliveira *et al.*, 2001)。由於煙草粉蝨屬於廣食性昆蟲，寄主植物範圍廣泛，外部形態變異

*論文聯繫人

Corresponding email: kocc2501@ntu.edu.tw
d93632001@ntu.edu.tw

臺灣番茄捲葉病毒之偵測 211

受寄主植物的影響，所以煙草粉蝨被認為是一個種群 (species complex)，依據其分佈範圍、酯酶分析和交配行為等，將煙草粉蝨區分為至少 24 型生物小種 (biotypes) (Perring, 2001; Ko *et al.*, 2002)。臺灣地區煙草粉蝨有 An 和 Nauru 二型本土生物小種及入侵 B 型生物小種 (Hsieh *et al.*, 2005, 2006)。近年來，原先只分佈於環地中海地區的 Q 型生物小種，也已入侵臺灣地區 (Hsieh *et al.*, 2007, 2008)。因此，臺灣地區煙草粉蝨目前有四型生物小種分佈。

煙草粉蝨是熱帶、亞熱帶及溫帶地區的重要農業害蟲之一 (Brown *et al.*, 1995)，透過取食植物汁液、傳播植物病毒和引起植物生理異常的危害，造成許多農業地區糧食及經濟作物上相當大的損失，而當中最嚴重的危害方式是傳播植物病毒，尤其以雙生病毒 (whitefly-transmitted geminivirus, WTG) 最受到重視。根據國外的研究指出，煙草粉蝨田間大爆發之後不久，其所傳播雙生病毒的遺傳變異會隨之增高 (Bedford *et al.*, 1994)，許多新發現的植物病毒可能與煙草粉蝨 B 型生物小種的大發生相關 (Polston and Anderson, 1997)。B 型生物小種具有廣泛的寄主範圍以及較強的傳播病毒病能力 (Rybicki and Pietersen, 1999)，而其他生物小種亦有傳播雙生病毒的能力 (Brown *et al.*, 1995)，例如分佈於環地中海地區的 Q 型生物小種，巴基斯坦的 K 型生物小種，以及非洲的 cassava 型生物小種，同樣的都造成該地區相當嚴重的農業損害。

臺灣地區造成經濟危害較為嚴重的雙生病毒是臺灣番茄捲葉病毒 (*Tomato leaf curl Taiwan virus*, ToLCTWV)，此病毒於 1981 年首次在南臺灣發現，屬於單股的 DNA 雙生病毒，宿主範圍小，主要宿主為番茄、煙草和

曼陀羅等 (Green *et al.*, 2005)。ToLCTWV 感染番茄時，其病徵為葉緣與葉脈皺縮或輕微黃化，葉緣向上或向下捲曲成杯狀，植株會嚴重矮化，生長停滯，開花數減少導致結果數量減少或不結果。此病毒在臺灣北、中、南、東部番茄栽種區均有發現，是臺灣地區番茄栽培的重要病害之一 (Green *et al.*, 2005)。臺灣地區 ToLCTWV 大規模發生危害番茄作物，可能與煙草粉蝨 B 生物小種入侵臺灣有關，前人研究也偏重於 B 生物小種造成的危害，而臺灣本土的 An 和 Nauru 型生物小種，在田間是否也會傳播 ToLCTWV 造成危害，是個值得探討的議題。

本研究將針對臺灣地區經濟重要性較為重要的 ToLCTWV 進行研究，廣泛採集臺灣各地區番茄作物上的煙草粉蝨，以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅雙生病毒鞘蛋白 (coat protein, CP) 基因片段，偵測其體內是否攜帶 ToLCTWV，並統計其帶毒比例。同時利用，序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified region, SCAR)，鑑別所採集之煙草粉蝨生物小種，以瞭解生物小種與田間傳播 ToLCTWV 的相關性。

材料與方法

一、煙草粉蝨樣品採集與保存

自 2002~2007 年採集臺灣地區各地田間番茄作物上之煙草粉蝨，經形態鑑定，確認為煙草粉蝨後，將成蟲浸泡於 95% 酒精溶液中，保存於 -20°C 冷凍櫃備用。

二、試驗方法

1. 萃取供試粉蝨及植株 DNA 模版萃取

單隻煙草粉蝨標本自酒精溶液中取出，以

二次蒸餾水清洗去除酒精，將清洗後之粉蝨標本置於 1.5 ml 之微量離心管中，利用 Wizard Genomic DNA Purification Kits (Promega, Madison city, USA) 純化試劑組進行總體 DNA 模版萃取。植株 DNA 模版萃取，取感染 ToLCTWV 之番茄葉片組織 0.1 g，置於研鉢中加入液態氮研磨，於植物組織未解凍前迅速倒入 1.5 ml 微量離心管中，亦利用 Wizard Genomic DNA Purification Kits 純化試劑組進行病毒 DNA 模版萃取，以作為試驗進行時病毒之正對照。

2. 煙草粉蝨生物小種之分子鑑定

應用序列特徵化增幅區域 (SCAR) 來進行煙草粉蝨生物小種之鑑定 (Ko *et al.*, 2007)。

3. 聚合酶連鎖反應 (PCR) 偵測 ToLCTWV

PCR 偵測田間煙草粉蝨體內之 ToLCTWV，利用 Yang (2000) 針對臺灣地區雙生病毒鞘蛋白 (CP) 基因片段所設計之引子對 GCP-1 (5'-GGCATGCCATGGCGAAGCGACCCGCCG-3')/GCP-2(5'-GCGCGGATCCTTAATTTTGTATCGAATCATAG-3')。反應溶液包含 1 μ l 的 DNA 萃取液，2U Taq DNA polymerase，10X Taq 緩衝液 4 μ l，25 mM dNTP 0.4 μ l 及 10 mM 之上下游引子各 0.5 μ l，最後加入二次蒸餾水，使總體積為 50 μ l。PCR 反應進行條件為：(1) 預熱 (prewarm) 94°C/2 分鐘。(2) 變性 (denaturing) 94°C/1 分鐘，使 DNA 變性鍵結打開成單鏈；黏合 (annealing) 55°C/1 分鐘，使 DNA 模版與引子結合；延伸 (extension) 72°C/1 分鐘，進行 DNA 複製的延伸作用；重複 35 個循環。(3) 最後延伸 (final extension) 72°C/10 分鐘，使反應完

全。PCR 產物以含溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 之 TAE 緩衝溶液，用 1% 之瓊脂電泳膠片進行電泳分析，於 UV 光下觀察、拍照並觀察其擴增片段。

4. PCR 產物純化與定序

以 QIA quick Gel Extraion Kit (Promega) 純化試劑組進行 PCR 產物回收，避免非標的產物干擾，委由昕穎生物科技公司定序而獲得 DNA 序列。

三、資料分析

1. 序列之比對與排序

定序所得的正反股序列，利用 DNASTAR (Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, USA) 分析軟體的 SeqMan 整合成完整之正股序列，接著以 ClustalX 1.8 (Thompson *et al.*, 1997) 軟體進行核苷酸序列排列，再以 GeneDoc 軟體 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>) 進行序列校正，並使用 NCBI 網頁 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 之 GenBank 中的 BLAST 功能進行序列比對，以確認是否為 ToLCTWV。GenBank 下載 ToLCTWV 相關序列 (表一) 與臺灣地區之樣品 (表二) 進行後續分析。

2. 遺傳距離 (genetic distance)

利用 Kimura's 2-parameter model 來計算各地 ToLCTWV 間之遺傳距離值，利用 MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) 進行運算。

3. 親緣關係樹之建立

(1) 鄰接法 (neighbor-joining method) 重建親緣關係樹

表一 下載自 GenBank 的臺灣蕃茄捲葉病毒鞘蛋白基因序列

Table 1. Accession numbers of the *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) coat protein (CP) sequences from GenBank

Acronym	Haplotype	GenBank accession no.	Host plant	Location
DQ237918China	28	DQ237918	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomato	Guangdong, China
DQ866122TN	29	DQ866122	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomato	Tainan, Taiwan
DQ866123HL	8	DQ866123	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomato	Hualien, Taiwan
DQ866125CH	31	DQ866125	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomato	Changhua, Taiwan
DQ866126HC	26	DQ866126	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomato	Hsinchu, Taiwan
DQ866127TY	32	DQ866127	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomato	Taoyuan, Taiwan
DQ866128CI	27	DQ866128	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomato	Chiayi, Taiwan
DQ866130TT	11	DQ866130	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomato	Taitung, Taiwan
U88692TN	30	U88692	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomato	Tainan, Taiwan

表二 臺灣地區臺灣蕃茄捲葉病毒鞘蛋白基因序列用於親緣關係分析之樣品

Table 2. Coat protein (CP) sequences of the *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) collected in Taiwan used for the phylogenetic analysis

Acronym	Haplotype	Biotype	Location
1864TN	17	B	Guantian, Tainan
1895IL	6	B	Sansing, Yilan
2126CH	13	B	Yanpu, Changhua
2557HL	1	B	Jian, Hualien
2559TT	3	B	Taitung City
2561TT	9	B	Luye, Taitung
2564KH	23	B	Lujhu, Kaohsiung
2565PT	24	B	Jiouru, Pingtung
2575YL	14	B	Siluo, Yunlin
2580NT	19	B	Jhushan, Nantou
2586CI	18	B	Taibao, Chiayi
3114CI	21	B	Singang, Chiayi
3298TC	15	B	Taichung City
3323HL	2	B	Jian, Hualien
3428TN	25	B	Houbi, Tainan
3579CI	16	B	Sikou, Chiayi
3663HC	22	B	Cyonglin, Hsinchu
3665ML	20	B	Zaociao, Miaoli
3671IL	4	B	Jiaosi, Yilan
3672IL	7	B	Jhuangwei, Yilan
3673IL	5	B	Yilan City
3686HL	10	B	Yuli, Hualien

表三 2002~2007 年臺灣地區煙草粉蝨樣品之臺灣蕃茄捲葉病毒檢測

Table 3. Infection ratio of the *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) detected from *Bemisia tabaci* populations in Taiwan from 2002 to 2007

Location	No. of samples (<i>n</i>)	No. of infections (<i>n</i>)	Infection percentage
Taoyuan	2 (10)	0	0
Hsinchu	4 (20)	1 (5)	25 (25)
Miaoli	2 (10)	1 (5)	50 (50)
Taichung	2 (10)	1 (5)	50 (50)
Changhua	5 (25)	4 (12)	80 (48)
Yunlin	10 (50)	5 (18)	50 (36)
Nantou	7 (35)	2 (8)	28.6 (22.9)
Chiayi	21 (105)	15 (54)	71.4 (51.4)
Tainan	23 (115)	14 (50)	60.9 (43.5)
Kaohsiung	11 (55)	5 (17)	45.5 (30.9)
Pingtung	5 (25)	2 (8)	40 (32)
Yilan	5 (25)	4 (12)	80 (48)
Hualien	9 (45)	5 (27)	55.6 (60)
Taitung	11 (55)	6 (15)	54.5 (27.3)
Total	118 (588)	65 (236)	55.1 (40.1)

n: individuals

以 Kimura's 2-parameter model 為運算模式來計算所有序列對的成對性遺傳距離並以鄰接法來重建系統發生樹，使用 bootstrap 運算 1000 次來檢測各分枝節點之支持度為信賴程度，利用 MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) 進行運算。

(2) 貝葉氏導出式 (Bayesian inference) 重建親緣關係樹

MrMODELTEST version 2.2 (Nylander, 2004) 用來搜尋最適合之核苷酸替換模式，Akaike information criterion (AIC) 準則選出 GTR + I + G model 為最佳模式。MrBayes version 3.1.2 程式 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) 用來重建親緣關係樹，以 Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo analyses 進行運算。隨機選取的樹為起始樹，總共運算 1×10^6 generations，而每 100 generations 取樣一次，並刪除前面未達穩定的 1×10^5 generations，重建之系統發

生樹以 50 % 多數決共同樹來表示，而分支節點值為後檢驗概率值表支持程度。

4. 親緣地理學之探討

最小跨度網狀圖 (minimum spanning network) 藉著計算單倍型 (haplotype) 核苷酸差異數，從差異小的開始連接，再連接差異大的，直到串聯成一網狀圖；利用 MINSPNET (Excoffier and Smouse, 1994) 軟體分析所得資訊，使用製圖軟體製作。藉著推測單倍型間之關聯性，並結合地理分佈資訊，探討單倍型與地理分佈之關聯性。

結 果

一、田間煙草粉蝨體內 ToLCTWV 之偵測

各地番茄作物上所採樣之煙草粉蝨，每筆採集樣品隨機取樣 5 隻粉蝨個體進行 PCR 檢測其是否攜帶 ToLCTWV，並鑑定煙草粉

表四 2002~2007 年各月份所採獲煙草粉蝨樣品檢測帶臺灣蕃茄捲葉病毒之結果

Table 4. Infection ratio of the *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) detected from *Bemisia tabaci* populations, by month, from 2002 to 2007

Month	No. of samples (<i>n</i>)	No. of infections (<i>n</i>)	Infection percentage
January	2 (10)	1 (5)	50 (50)
February	16 (80)	8 (33)	50 (41.3)
March	21 (105)	10 (30)	47.6 (28.6)
April	22 (110)	13 (46)	59.1 (41.8)
May	25 (125)	14 (53)	56 (42.4)
June	3 (15)	2 (7)	66.7 (46.7)
July	4 (20)	1 (3)	25 (15)
August	1 (5)	1 (5)	100 (100)
September	0	0	-
October	0	0	-
November	8 (40)	5 (20)	62.5 (50)
December	16 (78)	11 (30)	68.8 (38.5)
Total	118 (588)	65(236)	-

n: individuals

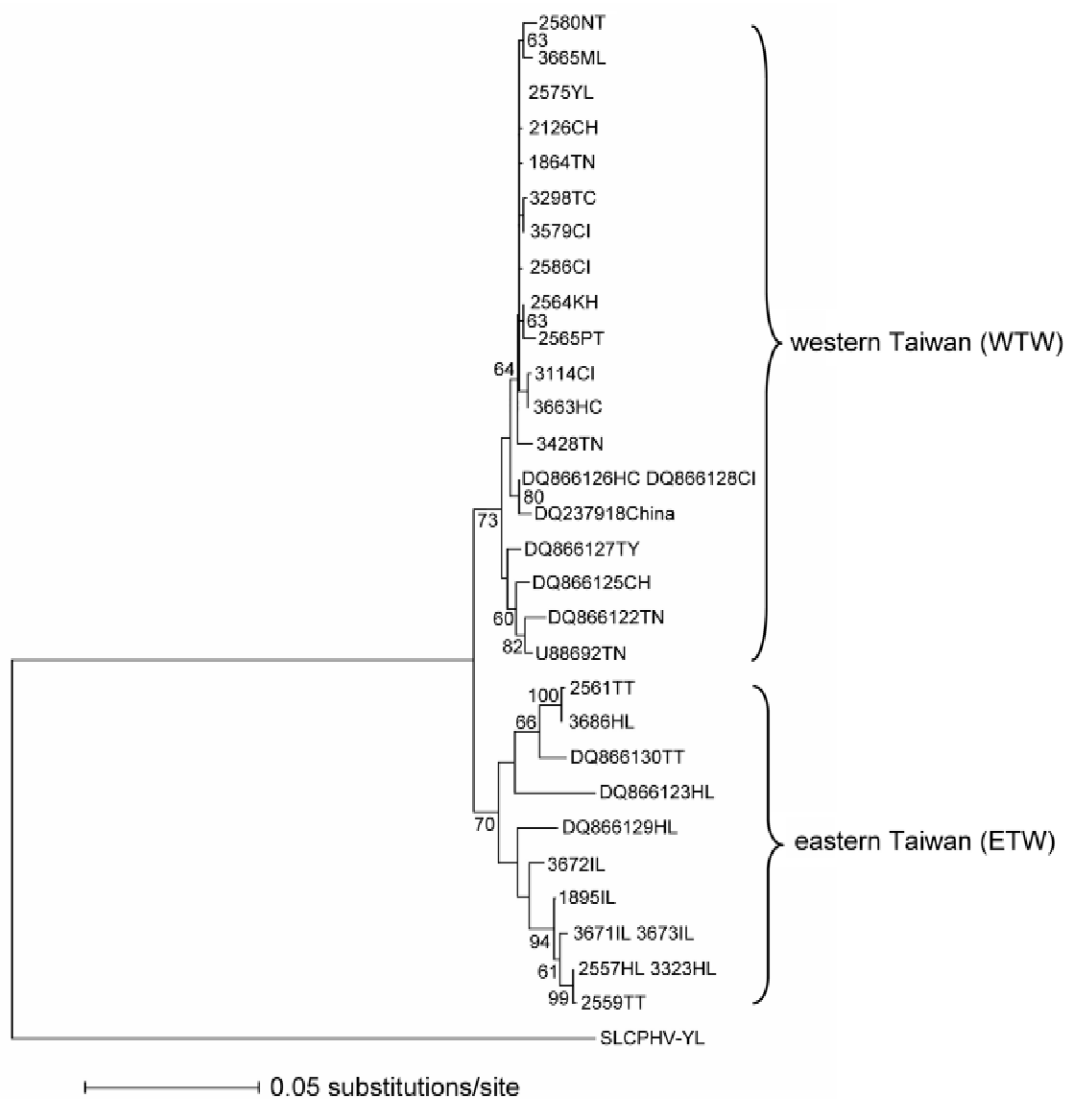
蝨之生物小種。全臺總計採集 118 筆樣品共 588 隻個體，其中 582 隻為 B 生物小種，4 隻為 An 生物小種，2 隻為 Nauru 生物小種。PCR 結果顯示，煙草粉蝨體內所增幅出之 ToLCTWV CP 基因約 780 bp，而增幅出此病毒者皆為煙草粉蝨 B 型生物小種，共計有 65 筆樣品共 236 隻個體偵測得 ToLCTWV，除桃園縣未偵測得 ToLCTWV，其餘各縣市煙草粉蝨樣品均測得 ToLCTWV 反應；臺灣各地田間番茄作物，煙草粉蝨體內帶 ToLCTWV 比例在 25~80% 之間 (表三)。

採集時間來看，各月份番茄作物田間採集樣品數、偵測得 ToLCTWV 樣品數及其比例如表四所示。番茄果實採收季節集中在 2~5 月及 11~12 月，期間所採獲樣品數較多，檢測出 ToLCTWV 的比例為 47.6~68.8%。部分月份因番茄作物休耕或栽種初期，僅有零星或無採集紀錄，除未採獲樣品月份外，全年各月份檢測出 ToLCTWV 的比例為 25~

100%。

二、臺灣地區 ToLCTWV CP 基因序列分析

本研究中來自臺灣各地的 ToLCTWV CP 基因序列 (表二) 及 GenBank 下載之序列 (表一)，利用採自雲林地區的菲律賓南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*, SLCPHV) 為外群，進行親緣關係樹之重建，以釐清臺灣各地 ToLCTWV 的親緣關係。鄰接法為基礎所重建之親緣關係樹 (圖一)，結果顯示臺灣各地之 ToLCTWV 可分為二群，西部的 ToLCTWV 構成同一單系群為西部群 (western Taiwan, WTW)，而東部 ToLCTWV 的構成另一單系群為東部群 (eastern Taiwan, ETW)。貝葉氏導出式所重建之親緣關係樹 (圖二)，結果顯示可分為三群，第 I 群廣泛分佈於臺灣西部，其中有一樣品來自中國廣東；第 II 群主要分佈於臺灣東部，但包含兩樣品來自臺灣西部之臺南；第 III 群分佈於臺灣西部之彰化。

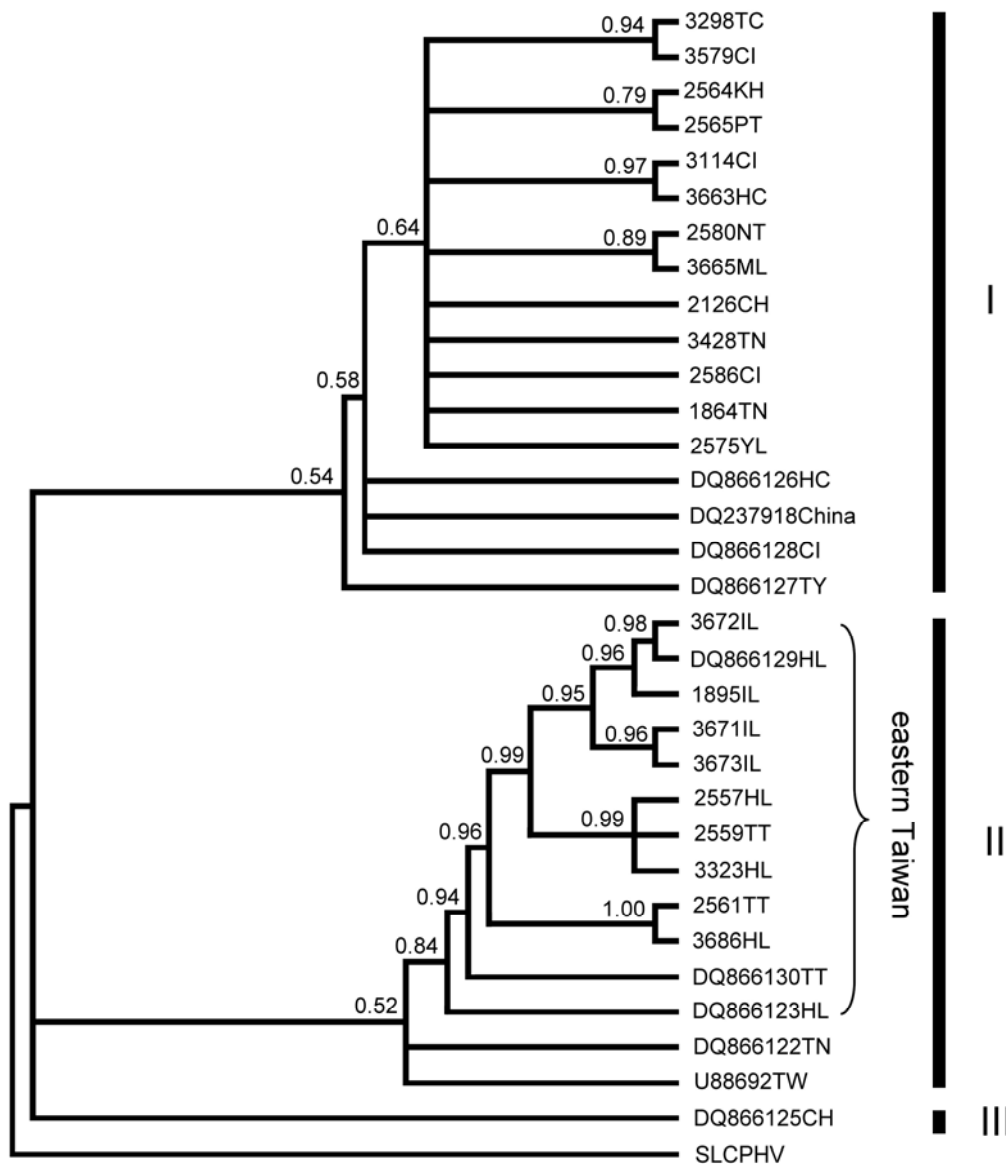


圖一 臺灣蕃茄捲葉病毒基因序列，利用鄰接法重建之親緣關係樹，並進行 1000 次 bootstrap 檢測，以菲律賓南瓜捲葉病毒為外群。

Fig. 1. Phylogenetic tree of coat protein (CP) gene sequences for *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) in Taiwan based on the Neighbor-joining method with 1000 bootstrap resampling replications. The outgroup was *Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV).

根據親緣關係樹之分析結果，臺灣西部各縣市（包含南投縣）的 ToLCTWV CP 序列，與自 GenBank 所下載一筆來自中國廣東的序列聚成西部群 (WTW)，群內序列相似

度為 97~100%，遺傳距離值介於 0~0.025。臺灣東部宜蘭、花蓮和臺東三地的 ToLCTWV 聚成東部群 (ETW)，序列相似度為 94~100%，遺傳距離值介於 0~0.054。

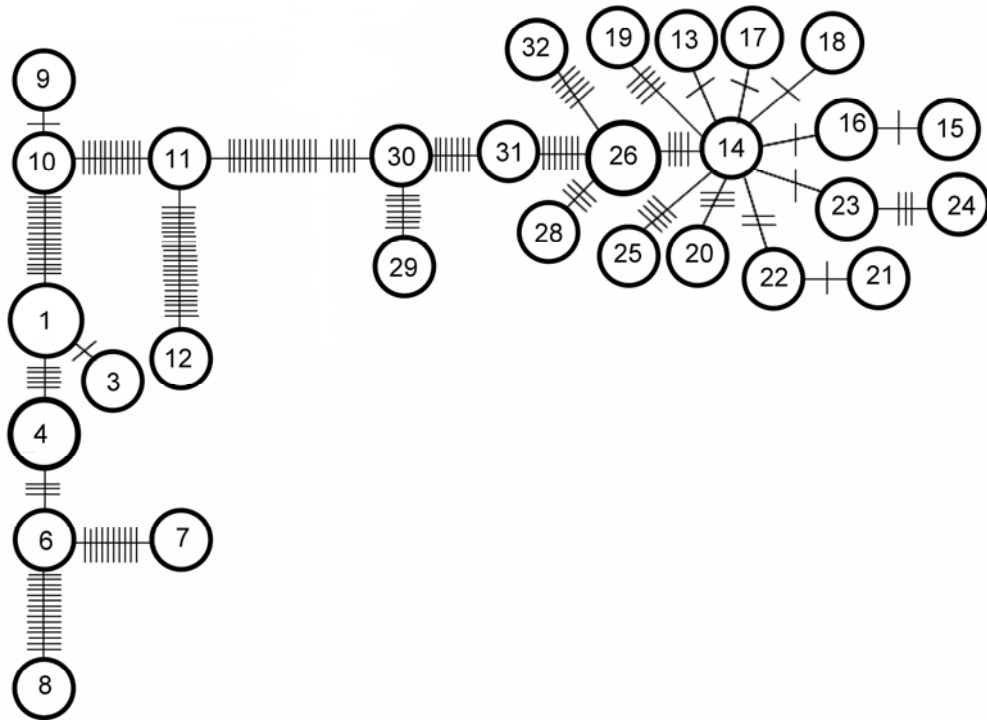


圖二 臺灣蕃茄捲葉病毒基因序列，利用貝葉氏導出式所重建之親緣關係樹，分支節點值為後檢驗概率值，以菲律賓南瓜捲葉病毒為外群。

Fig. 2. Phylogenetic tree of coat protein (CP) gene sequences for *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) in Taiwan based on Bayesian inferences. Numbers at the nodes are the posterior probability values. The outgroup was *Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV).

eastern Taiwan

western Taiwan



圖三 臺灣番茄捲葉病毒鞘蛋白基因單倍型之最小跨度網狀圖，刻度數目代表單倍型間核苷酸差異數。

Fig. 3. Minimum spanning network of haplotypes of the *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) based on coat protein (CP) gene sequences. Numbers at the branches indicate the number of nucleotide mutations between haplotypes.

臺灣東部群內，顯示宜蘭地區的 ToLCTWV 群聚在同支系，其餘花蓮、臺東兩地的族群相互交雜成多個支系。臺灣東、西部 ToLCTWV CP 序列相似度則在 94~97% 間，遺傳距離值介於 0.32~0.55。

ToLCTWV 單倍型間差異小，東部的 ToLCTWV 單倍型間差異大。東、西部群間，透過臺東的 DQ866130TT (haplotype 11) 與臺南的 U88692TN (haplotype 30) 相連結。

三、臺灣地區 ToLCTWV 親緣地理之研究

ToLCTWV CP 基因序列可分為 32 個單倍型 (表一、二)，網狀群聚分析結果 (圖三)，顯示臺灣地區 ToLCTWV 可明確區分為東部與西部等兩大地理群，西部的

討 論

一、煙草粉蝨傳 ToLCTWV 之偵測

番茄捲葉病在臺灣番茄栽種區均有發現，為番茄栽培的重要病害之一，主要由煙草

粉蝨傳播 ToLCTWV 造成 (Green *et al.*, 2005)。本研究藉由採集番茄田間煙草粉蝨並鑑定生物小種，以瞭解臺灣各生物小種傳播 ToLCTWV 之情形，結果顯示臺灣地區番茄田間 B 型生物小種的比例高達 98.97%，因此傳播 ToLCTWV 造成危害的主要是煙草粉蝨 B 型生物小種。

煙草粉蝨種 B 型生物小種具有較強的競爭取代能力、寄主範圍廣泛及強的生理適應性強，因此在國外許多地區已發現 B 型生物小種競爭並取代本土生物小種 (Perring *et al.*, 1993)。B 型生物小種尚未入侵臺灣前，田間只有 An 和 Nauru 兩型本土生物小種 (Hsieh *et al.*, 2005)，由於生理特性，使兩型生物小種在田間作物及其他植物上的族群密度並不高，因此煙草粉蝨傳播雙生病毒並未受到重視。自從煙草粉蝨 B 型生物小種入侵，造成臺灣地區農作物的嚴重損失後既受到重視 (Hsieh *et al.*, 2006)。本試驗結果亦符合國外研究的論點，當田間煙草粉蝨族群大爆發後不久，其所傳播的病毒病也會隨之大發生 (Bedford *et al.*, 1994)，而大爆發的煙草粉蝨族群通常是 B 型生物小種，許多新發現的植物病毒可能與煙草粉蝨 B 型生物小種的大發生有關 (Polston and Anderson, 1997)。因此，臺灣地區番茄捲葉病之大發生，推測為 B 型生物小種入侵後，傳播 ToLCTWV 病毒所造成。

自番茄田間所採獲的 118 筆煙草粉蝨樣品，經 PCR 檢測有 65 筆材料偵測得 ToLCTWV 反應，其中臺灣中南部番茄的主要產區採集的樣品較多。彰化縣以南至臺南縣地區所採獲的樣品，感染 ToLCTWV 樣品數百分比和粉蝨個體帶 ToLCTWV 百分比，均高於臺灣中北部、南投和高屏地區的樣品，顯示臺灣地區番茄主要栽種區 ToLCTWV 疫

情較非主要栽培區嚴重。

二、臺灣地區 ToLCTWV CP 基因序列之變異

雙生病毒的基因體序列中，鞘蛋白基因序列是屬於高度保守的片段，對於病毒與其病媒及宿主而言，扮演著病毒能否由病媒攜帶及傳染至宿主的關鍵性角色，在同一地理區的病毒其鞘蛋白胺基酸序列具高度相似性 (Harrison and Robinson, 1999)。雙生病毒中，*Begomovirus* 的分類是以基因體 DNA-A 序列，與其他病毒的相似度作為區分標準，當核苷酸序列與現有病毒株相似度低於 89% 時，可認定為新的病毒種 (species)，序列相似度達 90~91% 時，可認定為同一病毒種內的不同品系 (strain)；當序列相似度在 96~98% 時，可認定為變異株 (variant) (Fauquet and Stanley, 2005)。臺灣各地的 ToLCTWV CP 序列相似度上初步分為東、西部二變異株。臺灣西部變異株內序列相似度為 97~100%，東部變異株內的相似度則為 94~100%，而東部與西部的變異株間的相似度為 94~97%，透過比較鞘蛋白序列的相似度，初步認定臺灣地區 ToLCTWV 分為東、西部兩變異株。

三、ToLCTWV 親緣關係與親緣地理之研究

親緣關係樹分析，鄰接法之結果顯示 ToLCTWV 分為東、西部二變異株。西部變異株各樣品彼此間關係不明確，推測是由於番茄種苗或盆栽園藝作物買賣經人為擴散，加上西部平原開闊利於煙草粉蝨快速擴散並傳播雙生病毒，因此西部變異株沒有觀察到連續性遺傳變異且彼此間關係模糊。東部變異株則由於地形多山且多地形雨，限制了煙草粉蝨與其所傳播雙生病毒的擴散，加上東部地區栽培番茄面積並不廣闊，種苗買賣並不如西部頻繁，

因此 ToLCTWV 人為擴散的情形尚不嚴重。貝葉式導出式重建之親緣關係樹，區分出之三群皆包含西部樣品，而東部樣品僅與部分臺南樣品歸為同一群，推測臺灣東部之樣本來自臺灣西部。

ToLCTWV 親緣地理之研究，根據最小跨度網狀圖連接了臺灣東、西部兩變異株，東部變異株藉由臺東樣品與西部變異株臺南的樣品串連在一起，顯示出東西部間可能的擴散途徑。東、西部的 ToLCTWV 受到中央山脈的阻隔而形成兩變異株，但東、西部二變異株間仍可能在西南部地區有基因交流。西部變異株由於人為擴散的關係，已無法看出擴散的路徑，但由於臺南地區的 U88692 樣品，為亞蔬中心早年隔離的病毒株，保留了臺灣西南部原有的基因庫，因此得以在建構最小跨度網狀圖時，能夠銜接東部變異株，證明東部變異株源自西部變異株拓殖擴散形成，而根據親緣關係樹及觀察到連續性遺傳變異，推測東部變異株由東部的南方往北方擴散。

誌 謝

本研究承蒙臺灣大學昆蟲學系陳俊宏、陳陽發及施圓通等於標本採集上的協助，並感謝葛琳博士（亞洲蔬菜研究發展中心病毒組，臺南縣，臺灣）提供之材料。本研究承行政院國家科學委員會（NSC97-2621-B-002-008-MY3）和農業委員會動植物防疫檢疫局（97AS-14.3.1-BQ-B2）之經費補助，謹以致謝。

引用文獻

Bedford, I. D., R. W. Briddon, J. K. Brown, R. C. Rosell, and P. G. Markham. 1994. Geminivirus transmission and

biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 125: 311-325.

Brown, J. K., D. R. Frohlich, and R. C. Rosell. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* (Genn.), or a species complex? *Annu. Rev. Entomol.* 40: 511-534.

Excoffier, L., and P. E. Smouse. 1994. Using allele frequencies and geographical subdivision to reconstruct gene trees within a species: Molecular variance parsimony. *Genetics* 136: 343-359.

Fauquet, C. M., and J. Stanley. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Arch. Virol.* 150: 2151-2179.

Green, S. K., W. S. Tsai, S. L. Shih, Y. C. Huang, and L. M. Lee. 2005. Diversity of begomovirus of tomato and weeds in Asia. pp. 19-66. *In*: T. Y. Ku, C. L. Wang, and C. A. Chang, eds. *Proceedings of the International Seminar on Whitefly Management and Control Strategy*. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, Taipei, Taiwan, ROC.

Harrison, B. D., and D. J. Robinson. 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted

- geminivirus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 369-398.
- Hsieh, C. H., C. H. Wang, and C. C. Ko.** 2005. Identification of biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Taiwan based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Formosan Entomol.* 25: 255-267. (in Chinese)
- Hsieh, C. H., C. H. Wang, and C. C. Ko.** 2006. Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) species complex and distribution in eastern Asia based on mitochondrial DNA markers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 768-775.
- Hsieh, C. H., C. H. Wang, and C. C. Ko.** 2007. Evidence from molecular markers and population genetic analyses suggests recent invasions of the western north pacific region by biotypes B and Q of *Bemisia tabaci*. *Environ. Entomol.* 36: 952-961.
- Hsieh, C. H., F. S. Wu, Y. H. Chiang, H. T. Fang, and C. C. Ko.** 2008. Identification of a new invasive Q biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Taiwan by molecular markers. *Formosan Entomol.* 28: 221-234. (in Chinese)
- Huelsensbeck, J. P., and F. Ronquist.** 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ko, C. C., C. N. Chen, and C. H. Wang.** 2002. A review of taxonomic studies on the *Bemisia tabaci* species complex. *Formosan Entomol.* 22: 307-341. (in Chinese)
- Ko, C. C., Y. C. Hung, and C. H. Wang.** 2007. Sequence characterized amplified region marker for identifying biotype of *Bemisia tabaci* (Hem., Aleyrodidae). *J. Appl. Entomol.* 131: 542-547.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5: 150-163.
- Nylander, J. A. A.** 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolution Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Oliveira, M. R., V. T. J. Henneberry, and P. Anderson.** 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.* 20: 709-723.
- Perring, T. M.** 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot.* 20: 725-737.
- Perring, T. M., A. D. Cooper, R. J. Rodriguez, R. C. A. Farra, and T. S. Bellows.** 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* 259: 74-77.
- Polston, J. E., and P. K. Anderson.** 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis.* 81: 1358-1369.
- Rybicki, E. P., and G. Pietersen.** 1999. Plant virus disease problems in the

developing world. *Adv. Virus Res.* 53: 127-175.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.

Yang, S. H. 2000. Detection, Diagnosis and Molecular Variability of Begomoviruses in Southern and Central Regions in Taiwan. Master's Thesis. Graduate Institute of Entomology NCHU. (in Chinese)

收件日期：2009年9月1日

接受日期：2009年9月30日

Molecular Detection of *Tomato Leaf Curl Taiwan Virus* (ToLCTWV) from *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)

Fu-Sheng Wu¹, Chia-Hung Hsieh^{1*}, Wen-Bin Yeh², and Chiun-Cheng Ko^{1,3*}

¹ Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei City 10617, Taiwan

² Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung City 40227, Taiwan

³ Research Center for Plant Medicine, National Taiwan University, Taipei City 10617, Taiwan

ABSTRACT

Bemisia tabaci (Gennadius) is an important global agricultural pest. The economic impacts of this pest are primarily due to the damage it inflicts on the health of the host plant health by sucking the plant's juices, by fouling the life cycle of the plant, by secreting honeydew, and by transmitting plant viruses. The most serious damage caused by *B. tabaci* is its transmission of the *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) to tomato plants in Taiwan. In this study, *B. tabaci* was collected from tomato fields in Taiwan, and the coat protein (CP) gene of the ToLCTWV was isolated from *B. tabaci* by polymerase chain reaction (PCR). Four biotypes of *B. tabaci* have been recorded in Taiwan, and the sequence characterized amplified regions (SCARs) were used to identify the various biotypes. The results revealed that all collected ToLCTWVs were determined to be biotype B of *B. tabaci*. Analyses of the sequence identity, phylogeny, and phylogeography indicated that the ToLCTWV was separated into two variants (a western Taiwan (WTW) variant and an eastern Taiwan (ETW) variant), and that the ETW variant originated from the WTW variant. Phylogenetic relationship within the WTW variant was difficult to discern because of the low genetic variation and its high level of human trade activities. The ETW variant had a higher genetic variance because of its topography, climate, and its low level of human trade activities. The genetic variations suggest that the ETW variant dispersed from the south to north-eastern Taiwan.

Key words: *Bemisia tabaci*, biotype, *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV), phylogeny, phylogeography