

分蔥潛隱病毒親緣分析及應用巢式聚合酶鏈鎖反應 作分群偵測

林玫珠¹ 林羿廷² 蔡錦慧² 鄧汀欽^{3,*}

摘要

林玫珠、林羿廷、蔡錦慧、鄧汀欽。2018。分蔥潛隱病毒親緣分析及應用巢式聚合酶鏈鎖反應作分群偵測。台灣農業研究 67(3):270–282。

搜尋美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) GenBank 登錄之分蔥潛隱病毒種 (species *Shallot latent virus*; SLV) 分離株鞘蛋白基因核苷酸序列，進行親緣分析。本研究可將現有 SLV 分為 3 個分類群：第一群 (G1)、第二群 (G2)、第三群 (G3)。2015–2016 年間採集台灣的蔥屬植物樣品，進行酶聯抗體免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 及反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，檢出 10 株 SLV。將其鞘蛋白基因核苷酸序列定序，其中 6 株 SLV 鞘蛋白基因核苷酸長度為 894 bp，屬於第一群 (G1)；另外 4 株鞘蛋白基因核苷酸長度為 885 bp，屬於第三群 (G3)。不同 SLV 之病毒株鞘蛋白基因核苷酸序列的相同度大於 74.3%，胺基酸序列相同度大於 84.4%。根據所分類的各群病毒鞘蛋白基因核苷酸序列之差異，設計個別的專一性引子，進行 RT-PCR，並配合巢式-聚合酶鏈鎖反應 (nested-polymerase chain reaction; nested-PCR)，可針對第一群 (G1) 病毒株增幅出 187 bp 的條帶，第二群 (G2) 病毒株增幅出 548 bp 的條帶，第三群 (G3) 病毒株增幅出 540 bp 的條帶。將 134 個經 RT-PCR 測得 SLV 的蔥科作物樣本進行上述的 nested-PCR，其中 52 個蒜球與 25 個蒜苗的病毒株中，分別有 51 個與 24 個病毒株為第一群；11 個韭菜的病毒株皆為第三群，其中有 9 個另有檢出第一群者；34 個青蔥的 SLV 中，有 5 株為第一群，19 株為第三群、15 株均有檢出第一群與第三群者。由本研究所檢測的台灣蔥科作物中，並無發現第二群的 SLV 存在。

關鍵詞：分蔥潛隱病毒、蔥科作物、親緣分析、巢式-聚合酶鏈鎖反應。

前言

台灣生產的蔥科作物主要有蔥 (*Allium fistulosum*)、洋蔥 (*A. cepa*)、韭 (*A. tuberosum*)、青蒜 (*A. sativum*) 及大蒜 (*A. sativum* L.) 等，根據 2015 年農委會的農業年報 (<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>)，蔥科作物的產量總計約 249,000 Mg，產值高達 87 億元以上。目前台灣感染蔥科作物的病毒有 8 種，於田間常發生交互感染，系統性感染的寄生經無性繁殖後使得

病毒的傳播極為快速，繁殖幾代後，病毒病害發生率可達 100%。感染蔥科作物的病毒主要為 *Potyvirus* 屬的病毒種，如洋蔥黃萎病毒 (*Onion yellow dwarf virus*; OYDV)、韭蔥黃條斑紋病毒 (*Leek yellow stripe virus*; LYSV) 及分蔥黃條斑紋病毒 (*Shallot yellow stripe virus*; SYSV)，和 *Carlavirus* 屬的病毒種，如分蔥潛隱病毒 (*Shallot latent virus*; SLV)、大蒜潛隱病毒 (*Garlic latent virus*; GLV)、大蒜普通潛隱病毒 (*Garlic common latent virus*; GCLV) 及 Sint-Jan's 洋蔥潛隱病毒

投稿日期：2017 年 10 月 24 日。接受日期：2018 年 2 月 12 日。

* 通訊作者：tcde@tari.gov.tw

¹ 農業委員會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

² 農業委員會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

³ 農業委員會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

(*Sint-Jan's onion latent virus*; SjoLV)。若以無病毒繁殖體 (virus-free clones) 進行分蔥 (*Allium cepa* var. *ascalonicum* L.) 的生產，可提高 60% 的產量 (Ikeda & Imoto 1991)；而以不帶 SLV 的四季蔥為母株，將其組織培養繁殖種苗種植於田間，其株高、單株重及莖徑均比受 SLV 感染的植株高 (Deng *et al.* 2003)，顯示病毒感染蔥科作物會影響其品質及產量。

SLV 於 1978 年首次在紐西蘭的分蔥植株上被發現，不感染大蒜，可感染蔥、韭蔥、分蔥等蔥屬作物，但無明顯病徵；SLV 感染紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、綠藜 (*C. murale*) 及奎藜 (*C. quinoa*)，產生局部病斑。SLV 可經由冬蔥瘤蚜 (*Myzus ascalonicus*) 媒介傳播，此 SLV 之熱不活化點 (thermal inactivation point; TIP) 為 80°C (Bos *et al.* 1978)。1979 年，Lee *et al.* (1979) 在大蒜上發現同屬於 *Carlavirus* 的大蒜潛隱病毒 (GLV)，感染蠶豆造成系統性的壞疽病斑，在紅藜及奎藜上產生局部病斑，而感染番杏則產生黃化病斑，此 GLV 之熱不活化點 (TIP) 則介於 55–60°C 之間。但根據 Van Dijk (1993) 進一步的研究報告指出，自紐西蘭分離的 SLV 與日本發現的 GLV，彼此血清的沉澱反應相同，寄主範圍的接種測試結果僅些微差異，故認為 GLV 即是其分蔥潛隱病毒的大蒜系統 (簡稱 SLV-G)。2005 年國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 將感染大蒜的 GLV 正式歸類為 SLV (Fauquet *et al.* 2005)。

後來隨著分子生物技術的進步，Tsuneyoshi *et al.* (1998) 將中國、印度、紐西蘭、德國及台灣蔥科作物上的 SLV 與 GLV 進行鞘蛋白 (coat protein; CP) 基因核苷酸定序，發現 SLV 與 GLV 鞘蛋白基因核苷酸序列的相同度介於 89.2–99.3% 之間，更證實了 SLV 與 GLV 是相同的病毒。與其他國家已報導的 SLV 分離株相較下，由台灣蒜、韭、青蔥所分離的 SLV 分離株，其鞘蛋白的 N 端發生 3 個胺基酸缺失的現象，推測可能因為地理區隔產生的差異 (Tsuneyoshi *et al.* 1998)。因此，本研究試以分蔥潛隱病毒鞘蛋白基因核苷酸序列差異處設計專一性引子，對台灣蔥作物上的分蔥潛隱病毒進行調查，更

進一步瞭解台灣的分蔥潛隱病毒是否真的有其區域性。

材料與方法

病毒的來源與保存

本研究以採自田間的白蒜、和美蒜、大片黑蒜、韭菜及青蔥等，以蒜球或葉片進行酶聯抗體免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)，選取與本研究室製備之 SLV 抗血清 (Deng *et al.* 1991) 有正反應者，進行 SLV 病毒株的鑑定。其中，病毒株 SLV-GC、L2、S2 進行接種試驗，取 1 g 病組織加入 10 mL 0.05 M 磷酸緩衝溶液 (K_2HPO_4 , pH 7.5) 研磨粗汁液，以機械接種於奎藜葉片，接種後 3–14 d 產生黃化局部病斑，連續 3 次單斑分離後之病毒株葉片，以 50% 甘油 (glycerol, SIGMA, St. Louis, MO, USA) 保存於 -20°C，以供後續試驗進行。其中，SLV-GC、SLV-S2、SLV-S4、SLV-S33、SLV-ANG7、SLV-SH19 由青蔥分離的病毒株，SLV-L2 與 SLV-WF-L2 是由韭分離的病毒株，其餘 SLV 病毒株皆由白蒜、和美蒜或大片黑蒜所分離的病毒株，而 SLV-K 表示由韓國進口之大蒜分離的病毒株。

反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)

取 100 mg 罹病組織葉片或蒜瓣，以 RNA 純化試劑組 (Plant Total RNA Extraction Mini-prep kit, Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 萃取植物全量 RNA，RNA 保存於 -20°C 備用。應用可增幅出包含 SLV 全長度鞘蛋白核酸序列之專一性引子對 CAR-V1 (5'-AA ACCTTTTG-GTTCACCTTTAGG-3') 與 CAR-CP3 (5'-GTATG-CAACTTAAATATAGCACGC-3') (Tsuneyoshi *et al.* 1998) 進行 RT-PCR。RNA 先於 70°C 變性 10 min 後置於冰上，反應以單步驟 RT-PCR 試劑 (AccuPower RT-PCR Premix, Bioneer, Daejeon, Korea) 進行，於總反應體積 20 μ L 中，分別加入 1 μ L RNA、各 1 μ L 10 μ M 的引子對及 17 μ L 無菌水，於熱循環反應儀 Analytik Jena FlexCy-

cler2 (Life Science, Jena, Germany) 進行增幅。反應條件為 42°C 進行反轉錄 60 min, 95°C 5 min 將反轉錄酶去活化, 之後以 95°C 30 s⁻¹、55°C 30 s⁻¹、72°C 1 min⁻¹ 共進行 35 個循環, 最後於 72°C 聚合反應 10 min。反應結果以 1.2% 洋菜瓊脂進行電泳分析。

核酸片段選殖與序列分析

取上述 RT-PCR 之產物 2 µL 與 yT&A 載體 (T&A cloning kit, Yeasten Biotech, Taipei, Taiwan) 進行黏合, 之後轉型入 ECOS101 勝任細胞; 以 M13 Forward 及 M13 Reverse 引子對進行 PCR 選殖, 篩選含預期片段之選殖株, 委由明欣生

物科技公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 以自動核酸定序儀進行核酸定序。所獲得之核酸序列以 DNASTAR Lasergene v13.1 分析套組 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) 進行分析, 其中 alignment 以 Clustal W 分析。並選用完整鞘蛋白核酸序列進行後續之親緣關係分析。

分蔥潛隱病毒株之鞘蛋白核苷酸親緣關係分析

搜尋美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 登錄之 SLV 病毒株鞘蛋白基因核苷酸序列, 含完整鞘蛋白的病毒株共 51 株 (表 1), 分蔥潛隱病毒

表 1. 美國國家生物技術資訊中心登錄之分蔥潛隱病毒病毒株。

Table 1. List of isolates and accession numbers of SLV in GenBank of NCBI database.

Isolate	Host	Country	Accession no.	Reference
CLC-1	Chinese leek	Taiwan	AB004456	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
GC-2	Garlic	Taiwan	AB004457	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
CLC-1	Chinese leek	Japan	AB004458	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
WOC-2	Welsh onion	Taiwan	AB004544	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
RC-1	Rakkyo	Japan	AB004565	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
GNAG-9C2	Garlic	Japan	AB004567	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
GCHI-3C1	Garlic	China	AB004684	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
GUAE-13C1	Garlic	UAE	AB004685	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
GI-3C2	Garlic	Indonesia	AB004686	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
SI-4C2	Shallot	Indonesia	AB004802	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
LI-3C1	Leek	Indonesia	AB004803	Tsuneyoshi <i>et al.</i> (1998)
GLVc	Garlic	China	AF314147	unpublished (2000)
YH1	Garlic	China	AJ292226	Chen <i>et al.</i> (2001)
YH2	Garlic	China	AJ292227	Chen <i>et al.</i> (2001)
YH3	Garlic	China	AJ292228	Chen <i>et al.</i> (2001)
GarLV-HN	Garlic	China	AJ307034	Chen <i>et al.</i> (2002)
GarLV-BJ	Garlic	China	AJ310199	Chen <i>et al.</i> (2002)
GarLV-HB	Garlic	China	AJ409314	Chen <i>et al.</i> (2002)
GarLV-JS	Garlic	China	AJ409315	Chen <i>et al.</i> (2002)
GarLV-SD	Garlic	China	AJ409316	Chen <i>et al.</i> (2002)
GarLV-YN	Garlic	China	AJ409317	Chen <i>et al.</i> (2002)
GarLV-YN2	Garlic	China	AJ409318	Chen <i>et al.</i> (2002)
GarLV-YN3	Garlic	China	AJ409319	Chen <i>et al.</i> (2002)
GV-H	Garlic	Japan	D11161	Tsuneyoshi & Sumi (1996)
GV1	Garlic	Japan	D28591	Nagakubo <i>et al.</i> (1994)
M77SEQLAST	Welsh onion	Japan	D73379	unpublished (2002)

表 1. 美國國家生物技術資訊中心登錄之分蔥潛隱病毒病毒株 (續)。

Table 1. List of isolates and accession numbers of SLV in GenBank of NCBI database. (continued)

Isolate	Host	Country	Accession no.	Reference
GLV-K12	Garlic	South Korea	DQ520093	unpublished (2006)
Piraquara/PR	Garlic	Brazil	GU120175	Mituti <i>et al.</i> (2011)
Sao Manuel/SP	Garlic	Brazil	GU120176	Mituti <i>et al.</i> (2011)
cv. Morado	Garlic	Argentina	GU355922	Torrice <i>et al.</i> (2010)
Sao Manuel/SP	Garlic	Brazil	HQ128602	Mituti <i>et al.</i> (2011)
MS/SW/Aus2	Garlic	Australia	HQ258896	unpublished (2012)
WA-1	Garlic	Australia	JF320811	Wylie <i>et al.</i> (2012)
SW3	Garlic	Australia	JQ899443	unpublished (2012)
SG3	Garlic	Spain	JX429966	unpublished (2013)
AG2	Garlic	Australia	JX429968	unpublished (2012)
GLV-WH1	Rakkyo	China	JX513400	unpublished (2012)
GLV-WH2	Rakkyo	China	JX513401	unpublished (2012)
GLV-WH3	Rakkyo	China	JX513402	unpublished (2012)
GLV-WH4	Rakkyo	China	JX513403	unpublished (2012)
GLV-WH5	Rakkyo	China	JX513404	unpublished (2012)
GLV-WH6	Rakkyo	China	JX513405	unpublished (2012)
GLV-WH7	Rakkyo	China	JX513406	unpublished (2012)
GL200	Garlic	Poland	KF862704	Chodorska <i>et al.</i> (2014)
GL206	Garlic	Poland	KF862705	Chodorska <i>et al.</i> (2014)
GL207	Garlic	Poland	KF862706	Chodorska <i>et al.</i> (2014)
GL208	Garlic	Poland	KF862707	Chodorska <i>et al.</i> (2014)
GL210	Garlic	Poland	KF862708	Chodorska <i>et al.</i> (2014)
292	Garlic	Poland	KF862709	Chodorska <i>et al.</i> (2014)
410	Garlic	Poland	KF862710	Chodorska <i>et al.</i> (2014)
Wonju	Garlic	Korea	Z68502	unpublished (1996)
SLV-GC	Garlic	Taiwan	MF776508	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-L2	Chinese leek	Taiwan	MF776509	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-S2	Green onion	Taiwan	MF776510	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-S4	Green onion	Taiwan	MF776511	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-S33	Green onion	Taiwan	MF776512	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-20Y-7	Garlic	Taiwan	MF776513	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-3G-9	Garlic	Taiwan	MF776514	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-shen	Garlic	Taiwan	MF776515	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-SH19	Green onion	Taiwan	MF776519	Deng <i>et al.</i> (2016)
SLV-23-7-1	Garlic	Taiwan	MF776523	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-K1-9	Garlic	Korea	MF776525	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-K2-10	Garlic	Korea	MF776526	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-K4-10	Garlic	Korea	MF776530	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-K5-9	Garlic	Korea	MF776528	Lin <i>et al.</i> (2015)
SLV-KF8	Garlic	Korea	MF776529	Lin <i>et al.</i> (2015)

株之親緣關係以 DNASTAR Lasergene v13.1 分析套組 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) 之 MEGA7.0 進行分析，親緣關係演化樹以 Neighbor-joining 與 Boot-strap resampling 分析，其中 bootstrap values 由 1,000 重複取樣計算獲得。

巢式-聚合酶鏈鎖反應 (Nested-polymerase chain reaction; nested-PCR)

依據分蔥潛隱病毒鞘蛋白基因核苷酸序列 multiple alignment 結果，分別針對不同的分類群設計專一性引子對，第一群 (G1) 的專一性引子對為 SLVcpG1-up 與 SLVcpG1-dw，第二群 (G2) 的專一性引子對為 SLVcpG2-up 與 SLVcpG2-dw，而第三群 (G3) 的專一性引子對為 SLVcp-tw1 與 SLVcp-tw2，引子對序列詳如表 2。取經由 CAR-V1/CAR-CP3 引子對進行 RT-PCR 後之產物 2 μL ，以無菌水稀釋為 50 \times 後成為本巢式-聚合酶鏈鎖反應的模板。巢式-聚合酶鏈鎖反應的反應體積為 20 μL ，分別加入 1 μL RT-PCR 產物稀釋液、2 μL 10 \times PCR Buffer、1.6 μL dNTP、各 1 μL 10 μM 的引子對及 13.6 μL 無菌水，最後加入 0.1 μL Takara Taq DNA polymerase (Takara Bio USA, Inc., Santa Cruz, CA, USA)，於熱循環反應儀 Analytik Jena FlexCycler2 (Life Science, Jena, Germany) 進行增幅。反應條件為 95 $^{\circ}\text{C}$ 變性 5 min，之後以 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s^{-1} 、55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s^{-1} 、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min^{-1} 共進行 35 個循環，最後於 72 $^{\circ}\text{C}$ 聚合反應 10 min。反應結果以 1.2% 洋菜瓊脂電泳進行分析。

核酸片段選殖與序列分析

取 2 μL RT-PCR 產物與 yT&A 載體 (T&A cloning kit, Yeasten Biotech, Taipei, Taiwan) 進行黏合，之後轉型入 ECOS101 勝任細胞；以 M13

Forward 及 M13 Reverse 引子對進行 PCR 選殖，篩選含預期片段之選殖株，委由明欣生物科技公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 以自動核酸定序儀進行核酸定序。所獲得之核酸序列以 DNASTAR Lasergene v13.1 分析套組 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) 進行分析，其中 alignment 以 Clustal W 分析。

分蔥潛隱病毒株之親緣關係分析

搜尋 NCBI 登錄之 SLV 病毒株鞘蛋白基因核苷酸序列，含完整鞘蛋白的病毒株共 51 株 (表 1)，分蔥潛隱病毒株之親緣關係以 DNASTAR Lasergene v13.1 分析套組 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) 之 MEGA7.0 進行分析，親緣關係演化樹以 Neighbor-joining 與 Boot-strap resampling 分析，其中 bootstrap values 由 1,000 重複取樣計算獲得。

結果

分蔥潛隱病毒株之鞘蛋白核苷酸親緣關係分析

以引子對 CAR-V1 及 CAR-CP3 對大蒜、蔥及韭等病株 RNA 進行單步驟反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR)，來自不同分離株所獲得的核酸片段大小約介於 940–1,140 bp 之間，其中包含 885 bp 或 894 bp 的鞘蛋白核苷酸序列，可分別轉譯 294 或 297 個胺基酸。本研究完成定序者共 10 個分離株，均已登錄於 NCBI GenBank 獲得登錄序號 (accession number)，詳如表 1。

以 MEGA7.0 對本研究之各病毒株和 GenBank 上已有之 SLV 鞘蛋白核苷酸進行相同度分析 (表 1、圖 1)，不同 SLV 分離株鞘蛋白核苷酸

表 2. 分蔥潛隱病毒分類群的專一性引子對序列。

Table 2. Sequences of group specific primer pairs of SLV.

Group	Primer	Sequence	Product
Group 1	SLVcpG1-up	AACAGAKTGAAGAAYTTGCC	187 bp
	SLVcpG1-dw	GTCACATTWATGCTAGATAATT	
Group 2	SLVcpG2-up	AGTAACGTGCAGAAAMTTGCCG	548 bp
	SLVcpG2-dw	AGCGRGCAGACTTGSCGCAA	
Group 3	SLVcp-tw1	AACTCRGTAASTGCCGACTCGC	540 bp
	SLVcp-tw2	ACGGCAAATGKCGCAGWGTMG	

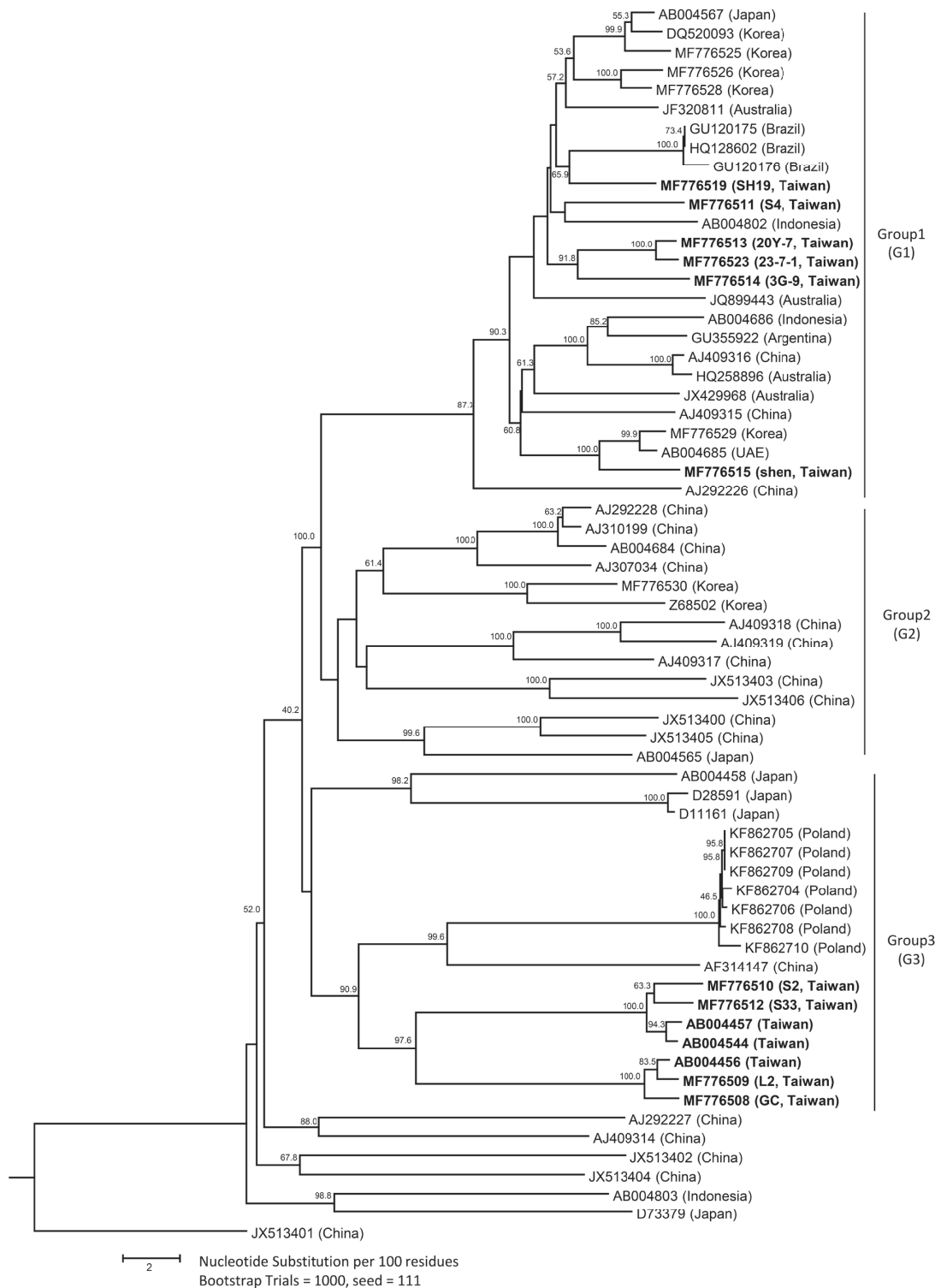


圖 1. 分蘖潛隱病毒株鞘蛋白核苷酸之親緣分析。

Fig. 1. Phylogenetic analysis of coat protein gene of *Shallot latent virus*.

序列之相同度大於 74.3%，胺基酸序列相同度大於 84.4%。

本研究依據鞘蛋白基因核苷酸序列可將 SLV 分為三群：第一群 (G1) 有 26 個病毒株，分屬於 9 個不同國家，彼此間核苷酸之相同度介於 86.2–99.1%，胺基酸相同度介於 93.6–100.0%。其中，台灣分離株 SLV-SH19 (MF776519)、S4 (MF776511)、20Y-7 (MF776513)、23-7-1 (MF776523)、3G-9 (MF776514) 與印尼的病毒株 AB004802 較為相近 (圖 1)；鞘蛋白的第 9、24 與 62 個胺基酸為第一群病毒株特有之高度保留區，分別為天門冬醯胺 (asparagine, N)、天門冬胺酸 (aspartic acid, D) 與胺基丙酸 (alanine, A) (圖 2)。第二群 (G2) 的 14 個病毒株中，11 個來自於中國大陸，2 個分離自韓國，1 個從日本分離的，核苷酸序列之相同度介於 76.4–98.4%，胺基酸的相同度介於 90.9–100.0%；其中，第 10、12、61 與 115 個胺基酸為第二群病毒株特有之高度保留位置，分別為天門冬醯胺、麩胺酸醯胺 (glutamine, Q) 與二個甲硫胺酸 (methionine, M) (圖 2)。

而第三群 (G3) 之核苷酸相同度由 76.4–99.8%，3 個日本的病毒株歸於第一亞群，7 個波蘭與 1 個中國的病毒分離株歸於第二亞群，7 個台灣分離的病毒株 SLV-GC (MF776508)、SLV-L2 (MF776509)、SLV-S2 (MF776510)、SLV-S33 (MF776512) 與 1999 年分離之 CLC-1 (AB004446)、GC-2 (AB004457)、WOC-2 (AB004544) 同屬於第三亞群，而且自成一類 (圖 1)。其中，第二亞群與第三亞群的鞘蛋白基因，比第一、二群的病毒株少了 9 個核苷酸，位於第 29 到第 37 個鹼基位置上；在第三群特有之高度保留位置為第 29、51、151、185 與 190 個胺基酸，是為精胺酸 (arginine, R)、天門冬胺酸、胺基丙酸、息寧胺酸 (threonine, T) 與苯丙胺酸 (phenylalanine, F)，其次之保留位置為第 3、30、36 與 67 個胺基酸，為離胺酸 (lysine, K)、息寧胺酸、異白胺酸 (isoleucine, I) 與缬胺酸 (valine, V) (圖 3)。而為了區別台灣的病毒株，分別設計第一、二群及第三群之專一性引子，以分析田間分蘗潛隱病毒的發生。

巢式-聚合酶鏈鎖反應進行 SLV 之分群分析

針對 SLV 不同的分類群設計專一性引子對 (表 2)，將上述經核苷酸定序確定之產物進行巢式-聚合酶鏈鎖反應，第一群 (G1) 的專一性引子對為 SLVcpG1-up 與 SLVcpG1-dw，第二群 (G2) 的專一性引子對為 SLVcpG2-up 與 SLVcpG2-dw，而第三群 (G3) 的專一性引子對為 SLVcp-tw1 與 SLVcp-tw2，預期可增幅出 187 bp、548 bp 及 540 bp 的專一性條帶。對田間樣本進行分析，結果顯示，病毒株 SLV-S4、SLV-SH19、SLV-4B-3 及 SLV-3G-9 能增幅出約 187 bp 的條帶，經定序分析確實屬於第一群；而病毒株 SLV-L2、SLV-S2、SLV-S33 及 SLV-WF-L2 僅在引子對 SLVcp-tw1 與 SLVcp-tw2 增幅時，獲得一 540 bp 的條帶，經選殖定序證實為第三群之序列無誤；而樣本 SLV23-7-1 同時可檢出 G1 與 G3 二種分類群的核酸條帶，由韓國進口蒜球所獲得的病毒株 SLV-K4-10 則可檢出 G1、G2 與 G33 種分類群的核酸條帶 (圖 4)。由上述結果證實，本研究針對分蘗潛隱病毒不同的分類群所設計的專一性引子對，能準確地應用於 SLV 鞘蛋白核苷酸分類群的鑑別。

台灣發生之分蘗潛隱病毒分類群之調查

將 RT-PCR 檢測出的 134 個具有 SLV 的植株，以上述 3 組 SLV 分類群的引子對，對台灣田間的分蘗屬作物進行 nested-PCR 檢測，包含 11 個韭菜、77 個大蒜、12 個洋蔥及 34 個青蔥樣本。結果顯示，有 111 株屬於第一分類群的病毒株，有 50 株為第三分類群，同時複合感染第一及第三分類群的植株共計有 30 株；而截至目前，在台灣尚未分離到第二群的病毒株 (表 3)。依作物來看，大蒜的部分，無論是蒜球或蒜苗有 96% 感染第一群的 SLV，僅 9% 同時複合感染第一與第三群的 SLV；然在韭菜與青蔥的部分，感染第三群 SLV 的機會高於第一群，感染率分別為 53% 與 93%，韭菜有 9 株為複合感染，青蔥有 12 株為複合感染 (表 3)。所檢測 15 個南韓進口蒜頭，15 個都帶有第一群的 SLV，其中 1 個複合感染第二群病毒株 (資料未顯示)。

	10	20	30	40	50	60	110	120
Group1 (G1)	MANEEEEELSRVKNLPTDRDPTIPEGERSKAVNDVGMEREGFEAVLRSESRFNKLEKCLSELSSINVT						PESNNLATAEELAKISAKVQ	
AB004567 (Japan)	.T.....N.....A.D.....IA.....							
DQ520093 (Korea)	.T.....N.....A.D.....IA.....							
MF776525 (Taiwan)	.T.....N.....A.D.....IA.....							
MF776526 (Korea)	.T.....N.L.....A.D.....D.....N.....IA.....							
MF776528 (Korea)	.T.....N.....N..AA.D.....D.....IA.....							
JF320811 (Australia)	.T.....N.....A.V.....R.....IA.....							
GU120175 (Brazil)	.T.....N.....M.....L.D.....MAD.....							
HQ128602 (Brazil)	.T.....N.....M.....L.D.....MAD.....							
GU120176 (Brazil)	.T.....N.....M.....L.D.....MAD.....							
MF776519 (Taiwan)	.T.....N.....V.D.....D.....IA.....							
MF776511 (Taiwan)	.T.....L.....H.....G.....D.....IA.....							
AB004802 (Indonesia)	.T.....LN.....E.V.....D.....IA.....							
MF776513 (Taiwan)	.E.....N..R.....V..S.....IA.....							
MF776523 (Taiwan)	.E.....N..R.....V..S.....IA.....							
MF776514 (Taiwan)	.E.....N.....V.D.....D.....IN.....							
JQ899443 (Australia)	.E.....N.....S..HN..V.D.Q.....IA.....							
AB004686 (Indonesia)	.T.....N.LQ.....V.D.....D.....IA.....							
GU355922 (Argentina)	.T.....N.....V.D.....D.....IA.....							
AJ409316 (China)	.T.....N.....R.....DE.....I.....MA.....							
HQ258896 (Australia)	.T.....N..R.....V..DE.....I.....MA.....							
JX429968 (Australia)	.T.....N.L.....V.....D.....IA.....							
AJ409315 (China)	.T.....N..R.....V.D.....I.D.....IA.....							
MF776529 (Korea)	.T.....N.L.....G.D.....IA.....							
AB004685 (UAE)	.T.....N.L.....G.D.....IA.....							
MF776515 (Taiwan)	.T.....N.L.S.....GND.....IA.....							
AJ292226 (China)	.T.....N..R.....N..EL.....D.....IA.....C.....							
Group2 (G2)								
AJ292228 (China)	.T.....N.Q.....R.....N.....M.....V.....M.....D.....							
AJ310199 (China)	.T.....N.Q.....R.....N.....M.....V.....M.....D.....							
AB004684 (China)	.T.....N.Q.....S.R.....N.....M.....V.....M.....D.....							
AJ307034 (China)	.T.....N.Q.S.....R.....N.....M.....V.....M.....D.....							
MF776530 (Korea)	.T.....NN.....H.....N.....M.....V.....M.....D.....							
Z68502 (Korea)	.T.....NN.....H.A.....-T.N.....M.....V.....M.....D.....							
AJ409318 (China)	.T.....I.N.QK.....V..DH.....MN.....V.....M.....D.....							
AJ409319 (China)	.T.....I.N.QK.....V..H.....N.....MN.....V.....M.....D.....							
AJ409317 (China)	.T.....I.N.R.....V..H.....N.....M.....V.....M.....D.....							
JX513403 (China)	.T.....I..NN.QK.....E..H.....M.....T.V.....M.....D.....							
JX513406 (China)	.T.....I..NN.QK.....E..H.....M.....T.....M.....D.....							
JX513400 (China)	.T.....K..AN.Q..R..E..H..R.....MA.....D.....							
JX513405 (China)	.T.....K..AN.Q..R..E..H..R.....MA.....D.....							
AB004565 (Japan)	.T.....K..AN.Q.....E..R.....MA.....V.....M.....D.....							

圖 2. 分蔥潛隱病毒分類群 G1 與分類群 G2 鞘蛋白胺基酸序列之差異。* 所有分蔥潛隱病毒的鞘蛋白保留序列。陰影方框表示高度保留區；實線方框表示次要保留區。

Fig. 2. Divergence of coat protein amino acid sequences between group 1 (upper 26 isolates) and group 2 (lower 14 isolates) of *Shallot latent virus*. The amino acids conserved in all SLV sequences are highlighted with asterisks. Solid line box: highly conserved; dotted line box: secondary conserved.

討論

Bos *et al.* (1978) 首次從分蔥植株分離出分蔥潛隱病毒 (SLV)，雖然在分蔥植株上無明顯病徵，但其可感染紅藜、奎藜產生局部壞疽病斑。隨後 Lee *et al.* (1979) 自大蒜分離出一株 *Carlavirus*，回接大蒜仍僅造成無病徵系統性感染，定名為大蒜潛隱病毒 (GLV)。直到 Van Dijk (1993) 對二者進行抗血清交叉反應測試，發現二者之血清與病毒株可相互反應，因此依血清學之關係認定二者皆為分蔥潛隱病毒，進而將日本學者 Lee *et al.* (1979) 由大蒜上分離的病毒株重新定名為分蔥潛隱病毒大蒜分離株 (SLV-G strain)。繼此，Tsuneyoshi *et al.* (1998) 以分子生物技術

進行該等病毒之鞘蛋白核苷酸序列分析，結果顯示在蔥科作物上分離的 SLV 與 GLV 之鞘蛋白基因相同度介於 89.6–98.0%，再次證實二者應屬相同病毒。依據 2011 年 ICTV 的定義，鞘蛋白核苷酸序列高於 72%，胺基酸序列高於 80% 屬於同一個 *Calavirus* 的種 (Hammond 2012)。將本研究 2015 年所登錄的台灣 10 個 SLV 分離株，與 GenBank 上已登錄之 SLV 和 GLV 分離株進行親緣分析，不同分離株之鞘蛋白核苷酸序列之相同度大於 74.3%，胺基酸序列相同度大於 84.4%，依據 ICTV 定義，此等分離株應屬 SLV 成員。

在 2015–2016 年由台灣蔥科作物分離之 SLV 行鞘蛋白核苷酸定序，並與目前 GenBank

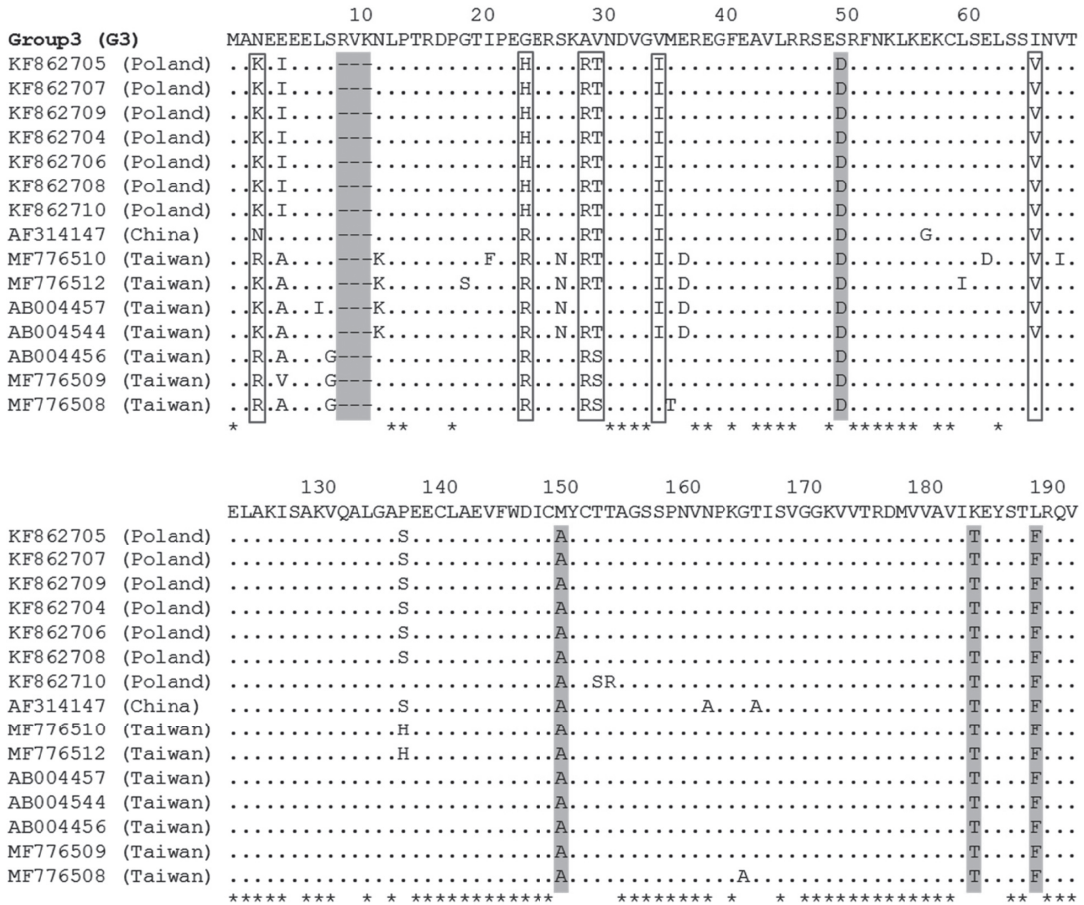


圖 3. 分蘗潛隱病毒鞘蛋白分類群 G3 胺基酸之差異。* 所有分蘗潛隱病毒的鞘蛋白保留序列。陰影方框表示高度保留區；實線方框表示次要保留區。

Fig. 3. Distinction of coat protein amino acid sequences of group 3 of *Shallot latent virus*. The amino acids conserved in all the sequences are highlighted with asterisks. Solid line box: highly conserved; dotted line box: secondary conserved.

登錄之所有 SLV 病毒株進行比對分析，發現由青蔥分離株 SH19 (MF776519)、S4 (MF776511) 和大蒜分離株 20Y-7 (MF776513)、23-7-1 (MF776523)、3G-9 (MF776514) 與印尼分離株 SI-4C2 (AB004802) 的親緣關係相近，其核酸相同度介於 90.7–91.8%，鞘蛋白核苷酸長度為 894 bp，歸屬於演化樹中的第一分類群。另外，台灣青蔥分離株 S2 (MF776510)、S33 (MF776512) 及韭菜分離株 L2 (MF776509)、大蒜分離株 GC (MF776508)，與 Tsuneyoshi *et al.* (1998) 自台灣分離的 CLC-1 (AB004456)、GC-2 (AB004457)、WOC-2 (AB004544) 自成一類，歸屬於第三分類群的第

三亞群，與波蘭的病毒株較為相近，其鞘蛋白核苷酸度為 885 bp、轉錄 295 個胺基酸，比第一、二分類群少了 9 個核苷酸、3 個胺基酸。Tsuneyoshi *et al.* (1998) 認為這 9 個核苷酸的缺失，可能是由於台灣經地理隔閡所造成分蘗潛隱病毒的變異。然而，根據本研究的調查，台灣現有的病毒株除了 1998 年分離的第三群病毒株外，大部分已轉變為第一分類群之病毒株，尤其是大蒜上面的病毒株，有 96% 為第一分類群。這很有可能與過去國內大蒜產量不足，曾以進口大蒜因應，使大蒜上之病毒發生轉變。在韭菜與青蔥上的病毒株則分別還有 53% 與 93% 為

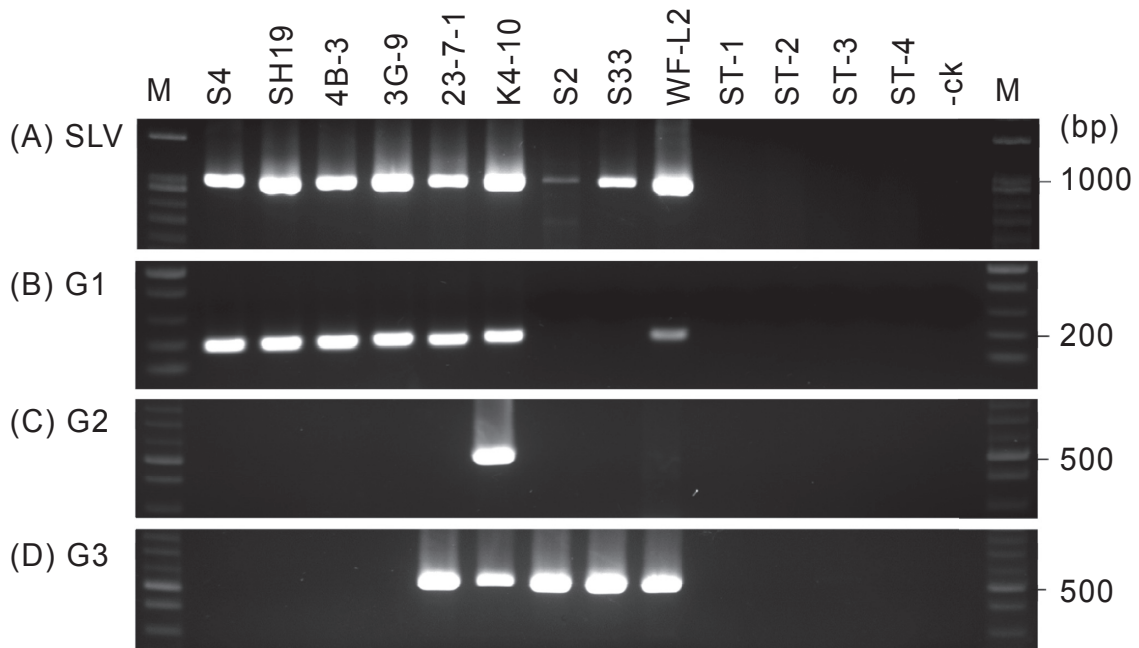


圖 4. 分蔥潛隱病毒鞘蛋白基因之分群測試。(A) 應用反轉錄 - 聚合酶鏈鎖反應檢出 SLV 陽性反應的分離株 S4、SH19、4B-3、3G-9、23-7-1、K4-10、S2、S33、WF-L2；(B) (C) (D) 應用巢式-聚合酶鏈鎖反應進一步分別鑑別出分類群 G1、G2、G3。

Fig. 4. Grouping tests of coat protein genes of shallot latent virus. SLV isolates (S4, SH19, 4B-3, 3G-9, 23-7-1, K4-10, S2, S33, and WF-L2) were identified by RT-PCR (A), and then separately detected by nested-PCR. SLV isolates of group 1 (G1) were showed in (B), group 2 (G2) in (C), and group 3 (G3) in (D).

表 3. 以巢式-聚合酶鏈鎖反應法進行台灣分蔥潛隱病毒鞘蛋白基因核苷酸分類群的調查結果。

Table 3. Nested-PCR based survey of SLV grouping by nucleotide sequences of coat protein gene in Taiwan.

Host	Source	No. of SLV	No. of grouping			Complex infecting
			Group 1	Group 2	Group 3	
Chinese leek	Wufeng Dist.	11	9	0	11	9
Garlic bulb	Wufeng Dist.	20	20	0	0	0
	Wufeng Dist.	16	15	0	0	0
	Mailiao Township	4	4	0	1	1
	Xiluo Township	3	3	0	3	3
	Wufeng Dist.	9	9	0	2	2
Garlic green	Wufeng Dist.	3	3	0	1	1
	Sanxing Township	8	8	0	0	0
	Ren'ai Township	14	13	0	0	0
Onion	Yilan City	12	12	0	1	1
Welsh onion	Wufeng Dist.	9	9	0	9	9
	Yilan City	13	2	0	13	2
	Yilan City	12	4	0	9	1
Total		134	111	0	50	30

第三群的分離株，確實有其地理上的區隔，產生台灣特有的 SLV 病毒株族群。

過去，RT-PCR 配合 nested-PCR 被應用於檢測低濃度或是標的基因不穩定的植物病毒樣本，或是為避免汙染而再一次確認檢測結果的正確性 (Jeong *et al.* 2014)。例如 Lee *et al.* (2015, 2016) 應用 RT-PCR 與 nested-PCR 技術於檢疫病毒的確認，包含菸草輪班病毒 (*Tobacco ringspot virus*) 及桃叢簇花葉病毒 (*Peach rosette mosaic virus*)。而本文卻是應用 RT-PCR 配合 nested-PCR 進行 *Shallot latent virus* 種內差異的分析，並將 SLV 的病毒株分成三群。

雖然研究報告指出 SLV 與 SLV-G 僅在寄主範圍有些微的差異表現 (Van Dijk 1993)，然而二者的熱不活化點 (TIP) 確有著明顯的差異。由 Bos *et al.* (1978) 分離的 SLV 其熱不活化點為 80°C，但 Lee *et al.* (1979) 分離之 SLV-G 的熱不活化點卻為 55–60°C，與 Deng *et al.* (1991) 自北蒜分離的 SLV-G 相同。未來將探討鞘蛋白核苷酸序列之差異，與其鞘蛋白的耐熱性或熱穩定性的關係。

引用文獻

- Bos, L., H. Huttinga, and D. Z. Maat. 1978. *Shallot latent virus*, a new carlavirus. *Neth. J. Plant Path.* 84:227–237.
- Chen, J., J. Chen, and M. J. Adams. 2001. Molecular characterization of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Arch. Virol.* 146:1841–1853.
- Chen, J., J. P. Chen, and M. J. Adams. 2002. Characterization of some carla- and potyviruses from bulb crops in China. *Arch. Virol.* 147:419–428.
- Chodorska, M., E. Paduch-Cichal, E. Kalinowska, and M. S. Szyndel. 2014. First report of *Onion yellow dwarf virus*, *Garlic common latent virus* and *Shallot latent virus* on garlic in Poland. *Plant Dis.* 98:858.
- Deng, T. C., J. Y. Liao, and H. Y. Yang. 2003. The incidence of *Shallot latent virus* and its effect on the growth of green onion in Yilan area. *Plant Pathol. Bull.* 12:191–198. (in Chinese with English abstract)
- Deng, T. C., S. W. Tsai, and T. W. Tsai. 1991. Occurrence of *Garlic latent virus* in Taiwan and its biological characterization. *J. Taiwan Agric. Res.* 40:333–345. (in Chinese with English abstract)
- Deng, T. C., Y. T. Lin, M. J. Lin, C. T. Chen, C. M. Chou, and C. H. Liu. 2016. Feasibility study of backtracking origins of garlic bulbs by phylogenetic characteristics of *Shallot latent virus* in the garlic. *J. Plant Medicine* 58:98–99. (in Chinese)
- Fauquet, C. M. and M. A. Mayo. 2005. Y, genus: *Garlavirus*. p.1101–1105. *in: Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* (Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, eds.). Academic Press, MA. 1162 pp.
- Hammond, J. 2012. Create three new species in the genus *Calarvirus*, family *Betaflexiviridae*. https://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/plant-official/4449. (visit on 2/19/2013)
- Ikeda, Y. and M. Imoto. 1991. Production of virus-free plants of *Allium wakegi* Araki by means of shoot apex culture and its efficiency. *Bull. Hiroshima Prefectural Agric. Expt. Station* 54:41–46.
- Jeong, J. J., H. J. Ju, and J. J. Noh. 2014. A review of detection methods for the plant viruses. *Res. Plant Dis.* 20:173–181.
- Lee, S., G. Lee, I. C. Choi, and J. Y. Rho. 2015. Development of PCR diagnostic system for detection of the seed-transmitted *Tobacco ringspot virus* in quarantine. *Indian J. Microbiol.* 55:231–233.
- Lee, S., C. S. Kim, Y. G. Shin, J. H. Kim, Y. S. Kim, and W. H. Jheong. 2016. Development of nested PCR-based specific markers for detection of *Peach rosette mosaic virus* in plant quarantine. *Indian J. Microbiol.* 56:108–111.
- Lee, Y. W., S. Yamazaki, T. Osaki, and T. Inouye. 1979. Two elongated viruses in garlic, *Garlic latent virus* and *Garlic mosaic virus*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 45:727–734.
- Lin, M. J., C. T. Chen, Y. H. Chien, T. C. Deng, C. M. Chou, and C. H. Liu. 2015. Phylogenetic analysis of coat protein gene of *Shallot latent virus*. *Plant Pathol. Bull.* 24:153. (in Chinese)
- Mituti, T., J. M. Marubayashi, M. F. Moura, R. Krause-Sakate, and M. A. Pavan. 2011. First report of *Shallot latent virus* in garlic in Brazil. *Plant Dis.* 95:227.
- Nagakubo, T., M. Kubo, and K. Oeda. 1994. Nucleotide sequences of the 3' regions two major viruses from mosaic-diseased garlic: Molecular evidences of mixed infection of a potyvirus and a carlavirus. *Phytopathology* 84:640–645.
- Torrico, A. K., E. E. Cafrune, and V. C. Conci. 2010. First report of *Shallot latent virus* in garlic in Argentina. *Plant Dis.* 94:915.
- Tsuneyoshi, T. and S. Sumi. 1996. Differentiation among

- garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. *Phytopathology* 86:253–259.
- Tsuneyoshi, T., T. Matsumi, T. C. Deng, I. Sako, and S. Sumi. 1998. Differentiation of *Allium* carlaviruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. *Arch. Virol.* 143:1093–1107.
- Van Dijk, P. 1993. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. *Neth. J. Plant Pathol.* 99:233–257.
- Wylie, S. J., H. Luo, H. Li, and M. G. Jones. 2012. Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Arch. Virol.* 157:271–284.

Phylogenetic Analysis and Grouping Detection of Species *Shallot latent virus* by Nested-PCR

Mei-Ju Lin¹, Yi-Ting Lin², Chin-Hui Tsai², and Ting-Chin Deng^{3,*}

Abstract

Lin, M. J., Y. T. Lin, C. H. Tsai, and T. C. Deng. 2018. Phylogenetic analysis and grouping detection of species *Shallot latent virus* by nested-PCR. *J. Taiwan Agric. Res.* 67(3):270–282.

The coat protein (CP) gene nucleotide sequences of species *Shallot latent virus* (SLV) collected from National Center for Biotechnology Information (NCBI)-GenBank database were tested for phylogenetic analysis. All the current SLV isolates tested were clustered into three groups: G1, G2 and G3. In 2015–2016, a total of 10 SLV-infected *Allium* materials were collected from a survey of SLV occurred in Taiwan by detecting the virus with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The CP genes of each isolates were cloned and sequenced, among 10 isolates tested, 6 isolates were clustered into G1 with 894 bp nucleotides. The others belong to G3 with 885 bp nucleotides of CP gene. Based on divergence of CP nucleotide sequences, the group specific primer pairs were designed to differentiate the groups. Following by a RT-PCR, the nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) was performed, and the amplified DNA was 187 bp, 548 bp and 540 bp for G1, G2 and G3, respectively. Accordingly, 134 SLV-infected samples were collected and detected by RT-PCR and nested-PCR as described above. There were 51 out of 52 garlic bulbs and 24 out of 25 garlic plants were identified as G1. Moreover, a total of 11 samples from Chinese leeks were defined as G3, and 9 samples out of them were complex with G1 and G3. The other 34 samples tested from green onions were consisted of 5 belonged G1, 19 belonged G3 and 15 were complex with G1 and G3. In this study, no SLV isolates belonged G2 were found from *Allium* in Taiwan.

Key words: *Shallot latent virus*, *Allium* species, Phylogenetic analysis, Nested-polymerase chain reaction.

Received: October 24, 2017; Accepted: February 12, 2018.

* Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.