

檢測銀葉粉蝨體內南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*) 專一性引子開發

鄭櫻慧¹ 林漢釗² 林鳳琪^{3,*}

摘要

鄭櫻慧、林漢釗、林鳳琪。2015。檢測銀葉粉蝨體內南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*) 專一性引子開發。台灣農業研究 64(2):135–144。

以銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring) 為媒介所傳播的南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*, SLCPHV)，係近年來在台灣中南部瓜類上常見的病毒病害，造成農民嚴重的損失。除了此病毒外，銀葉粉蝨尚可傳播其他的豆類金黃嵌紋病毒屬 (*Begomovirus*) 的病毒。因此，必須開發比原有簡併式 CP1up/dw 更具專一性的引子對，以提高在田間進行南瓜捲葉病毒病害監測及銀葉粉蝨體內帶毒率偵測的準確度。本試驗利用滾環式擴增法擴增 SLCPHV 及 3 種田間常見的豆類金黃嵌紋病毒屬病毒番茄捲葉新德里病毒 (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV)、藿香薊葉脈黃化病毒 (*Ageratum yellow vein virus*) 及木瓜捲葉廣東病毒 (*Papaya leaf curl Guangdong virus*)，以 Bam HI 進行酶切，經選殖、定序、比對後，設計出可針對 SLCPHV 的專一性引子對 SLCVup/dw，並在田間常見的 8 種瓜類作物與銀葉粉蝨蟲體上進行測試。結果顯示，使用專一性引子對 SLCVup/dw 只會偵測到感染瓜類的 SLCPHV 或 ToLCNDV，以其檢測結果估算田間帶毒粉蝨之族群密度逐漸增加，與洋香瓜罹病率逐漸升高之趨勢相符。相較於簡併式引子對，顯示此專一性引子對具有更好的靈敏度及準確度，未來可應用於田間病害偵測及帶毒銀葉粉蝨之監測。

關鍵詞：銀葉粉蝨、南瓜捲葉病毒、瓜類、引子。

前言

南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*, SLCPHV) 屬於雙生病毒科 (Geminiviridae) 中的豆類金黃嵌紋病毒屬 (*Begomovirus*)。Geminiviridae 的基因體為環狀單股的 DNA (circular ssDNA)，基因體大小為 2.7–3.0 kb。根據 Geminiviridae 的基因體結構、寄主範圍及媒介昆蟲等可分為 4 個病毒屬：*Mastrevirus*、*Curtovirus*、*Topocuvirus* 和 *Begomovirus*，其中以粉蝨傳播的 *Begomovirus* 為最大的一群，已超過 180 種病毒，具有高度的經濟重要性 (Fauquet *et al.* 2008)。在國內發生的

紀錄包括番茄捲葉台灣病毒 (*Tomato leaf curl Taiwan virus*; ToLCTWV)、番茄捲葉新竹病毒 (*Tomato leaf curl Hsinchu virus*; ToLCHsV)、番茄黃化捲葉泰國病毒 (*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*; TYLCTHV)、藿香薊葉脈黃化花蓮病毒 (*Ageratum yellow vein Hualien virus*; AYVHuV) (Jan *et al.* 2007; Tsai *et al.* 2011)、番茄捲葉新德里病毒 (*Tomato leaf curl New Delhi virus*; ToLCNDV) (Chang *et al.* 2010)、南瓜捲葉菲律賓病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*; SLCPHV) (Liao *et al.* 2007; Tsai *et al.* 2007)、甘藷捲葉病毒 (*Sweet potato leaf curl virus*; SPLCV) (Chung *et al.* 1985)、

投稿日期：2014 年 8 月 7 日；接受日期：2014 年 12 月 29 日。

* 通訊作者：fclin@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所應用動物組研究助理。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。

藿香薊葉脈黃化病毒 (*Ageratum yellow vein virus*; AYVV) (Wu *et al.* 2008)、聖誕紅捲葉病毒 (*Poinsettia leaf curl virus*; PLCV) (Tsai *et al.* 1997)、木瓜捲葉廣東病毒 (*Papaya leaf curl Guangdong virus*; PaLCuGDV) (Chang *et al.* 2003) 等。在台灣曾有新德里番茄捲葉病毒 (ToLCNDV) 感染東方型甜瓜的紀錄，但感染洋香瓜等高經濟價值葫蘆科作物仍以 SLCPHV 為主 (Lin *et al.* 2011)。

銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring) 為害農作物的情形相當嚴重，除了吸取作物汁液，造成葉片產生斑點、黃化、萎凋及提早落葉等徵狀；在害蟲大量發生時，因其分泌之蜜露排泄在作物上，導致煤煙病發生，阻礙葉片行光合作用，進而使植株衰弱、產量減少、降低商品價值等等，造成嚴重經濟損失 (Lin *et al.* 1997)。此外，銀葉粉蝨為多種植物病毒病害的媒介昆蟲，經由其傳播可造成約 40 多種蔬菜及纖維作物等雙子葉植物感染雙生病毒科病毒 (Jones 2003)。

瓜類作物是台灣重要的蔬果作物，常見瓜類作物有西瓜、洋香瓜、香瓜、胡瓜、苦瓜、冬瓜等。根據 2009 年農委會農業統計年報，瓜類作物的栽培面積約為 22,984 ha。瓜類作物在生長期間極易遭受到病毒病害感染，在台灣約有 16 種病毒可感染瓜類作物，其中由銀葉粉蝨傳播 *Begomovirus* 屬的 SLCPHV，幾乎可感染所有的瓜類作物且造成經濟損失 (Deng 2011)。2008 年在台南地區的洋香瓜，因該病毒的感染甚而導致全園廢耕的情形。該病毒的分布，主要於中部的彰化縣、雲林縣二崙鄉、崙背鄉，及南部的台南市的東山區、將軍區、七股區、佳里區、安南區等栽培地區都有發現 SLCPHV 的感染紀錄。在 SLCPHV 病害防治上，以傳播媒介棲群密度及帶毒率監控為首要工作項目。

由於粉蝨為許多植物病毒的傳播媒介，也是多種 *Begomovirus* 屬病毒的媒介昆蟲。以簡併式引子對 CP1up/dw 在田間粉蝨帶毒率偵測，易有誤判其帶毒率的情形，因此開發針對偵測 SLCPHV 之高專一性引子對，提高偵測粉蝨帶毒率準確度，實屬必要。

材料與方法

供試帶病植株來源

自台灣中南部及東部等地區，採集罹患有雙生病毒之植株作物，包括番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、紫花藿香薊 (*Ageratum houstonianum* Mill.)、聖誕紅 (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) 及洋香瓜 (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud.)、西瓜 [*Citrus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai.]、甜瓜 (*Cucumis melo* L. var. *makuwa* Makino)、哈密瓜 (*Cucumis melo* L. var. *saccharinus*)、扁蒲 (*Langenaria siceraria* Standl.)、南瓜 [*Cucurbita moschata* (Duchesne) Poir]、胡瓜 (*Cucumis sativus* L.)、冬瓜 (*Benincasa hispida* Thunb.) 等瓜類作物 (表 1)。

植物組織及粉蝨蟲體 DNA 之萃取

在本試驗中的帶病毒植株，切取其罹病葉片組織約 100 mg，以 Plant Genomic DNA Purification Kit (GENEMARK Technology, Taiwan) 萃取植物的 DNA。在粉蝨蟲體部分，以黃色黏板捕捉已刺吸取食罹病毒株之粉蝨，再以蟲針挑取單隻粉蝨，利用 EDNA HiSpEx Tissue Kit (Saturn Biotech, Perth, Western Australia) 萃取單一蟲體的 DNA。

病毒基因體分析

雙生病毒基因體利用滾環式擴增法 (Rolling Circle Amplification; RCA) (Inoue-Nagata *et al.* 2004) 增幅，以供試植株 DNA 1.25 μL 作為板模，加入引子 (5'-GGTAATATTA-3') 2.5 μL ，10 \times buffer 2.5 μL ，無菌水 15.5 μL ，95 $^{\circ}\text{C}$ 反應 3 min，放至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷卻 10 min 後加入 dNTP 1.25 μL 與 Phi29 (0.1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) (RepliPhi™ phi29 Reagent Set, EPICENTRE) 2 μL ，於 30 $^{\circ}\text{C}$ 反應 18 h，反應完之產物再以 65 $^{\circ}\text{C}$ 處理 10 min 終止反應。RCA 產物以 BamHI 或 HindIII 酶切，選殖至以 BamHI 或 HindIII 處理之 pBluescript SK(-) 載體，所得之選殖株委託明欣生物科技有限公司 (台北，台灣) 進行定序分析。

表 1. 供試豆類黃金嵌紋病毒屬病毒感染之植物。

Table 1. Plant samples showing symptoms of virus infection used to detect begomoviruses by PCR.

Host plant	Scientific name	Virus species (abbreviation)	Symptom ²
Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Tomato yellow leaf curl Thailand virus (TYLCTHV)	LCY
		Tomato leaf curl Taiwan virus (ToLCTWV)	LCY
Ageratum	<i>Ageratum houstonianum</i> Mill.	Ageratum yellow vein virus (AYVV)	YV
Poinsettia	<i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd. ex Klotzsch	Papaya leaf curl Guangdong virus (PaLCGDV)	LYS
Melon	<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>reticulatus</i> Naud	Squash leaf curl Philippines virus (SLCPHV)	LYS
Cantaloupe	<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>saccharinus</i>	Squash leaf curl Philippines virus (SLCPHV)	LYS
Orient melon	<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>makuwa</i> Makino	Squash leaf curl Philippines virus (SLCPHV)	MLY
Watermelon	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai	Squash leaf curl Philippines virus (SLCPHV)	MLY
Bottle gourd	<i>Lagenaria siceraria</i> Standl.	Squash leaf curl Philippines virus (SLCPHV)	SLCM
Pumpkin	<i>Cucurbita moschata</i> (Duchesne) Poir	Squash leaf curl Philippines virus (SLCPHV)	SLCM
Cucumber	<i>Cucumis sativus</i> L.	Squash leaf curl Philippines virus (SLCPHV)	MLY
Wax gourd	<i>Benincasa hispida</i> Thunb.	Squash leaf curl Philippines virus (SLCPHV)	SLCM

² LCY: leaf curl and yellowing; YV: vein yellowing; LYS: leaf yellowing and stunting; MLY: mild leaf yellowing; SLCM: severe leaf curl and mosaic.

引子之設計與聚合酶連鎖反應

試驗中使用之引子對 CP1up/dw [TGTGA (A/G)GG(A/T/G/C)CC(A/T/G)TGTA(A/G)GT/GG(A/G)(T/G)T(A/T/G)(C/G)(A/G)(A/G)(T/G)CATG(T/A/C)GTACA(T/G)G] 係以 Wyatt & Brown (1996) 設計之簡併式引子對為模本，參考感染台灣葫蘆科作物之 SLCPHV，加以修飾成而成。另以感染台灣葫蘆科作物之 SLCPHV 與 ToLCNDV 之 V2 基因設計一對專一性引子 SLCVup/dw [GTGGGCCCTC(A/G)ACCA(A/T)TGAAAT/AGGAAC(T/C)AG(A/T)AT(A/G)AGATC(A/G)C(T/G)(A/G)A]，這對引子可以偵測到 SLCPHV 與 ToLCNDV 反應，不會偵測到 begomoviruses 反應。

將供試植株與帶毒粉蝨 DNA 作為板模，利用聚合酶連鎖反應複製植株組織及蟲體內的病毒基因，來判別是否為其他雙生病毒或 SLCPHV。在植株部分，反應體積為 25 μ L，包含有 1 μ L DNA 模板，2.5 μ L 10 \times PCR buffer，2 mL 2.5 mM dNTP，0.1 μ L Ex-Taq polymerase (Takara Chuzo Co., Shiga, Japan)，加入之引子對上下端為 1 μ L 20 mM。在粉蝨部分則是加入 DNA 模板增為 3 μ L，反應條件為：先預熱至 92 $^{\circ}$ C 維持 1 min，接著 92 $^{\circ}$ C 反應 30 s，

降至 56 $^{\circ}$ C 反應 1 min 及 72 $^{\circ}$ C 反應 2 min，重複 30 個循環，最終反應在 72 $^{\circ}$ C 下持續 6 min，然後保存於 4 $^{\circ}$ C；而 SLCVup/dw 主要用來偵測 SLCPHV，具有較高的專一性，該引子所增幅片段大小約為 250 bp。反應條件則是先預熱至 92 $^{\circ}$ C 維持 1 min，接著 92 $^{\circ}$ C 反應 30 s，降至 52 $^{\circ}$ C 反應 30 s 及 72 $^{\circ}$ C 反應 1 min，重複 30 個循環，最終反應在 72 $^{\circ}$ C 下持續 6 min，然後保存於 4 $^{\circ}$ C。增幅完成之產物以 1.2% 瓊脂糖凝膠電泳，確認是否出現預期的片段。

田間銀葉粉蝨成蟲帶毒率之檢測

本試驗田位於雲林縣二崙鄉一處隧道式栽培洋香瓜田，第一期作植株自定植後於 2010 年 3 月 26 日設置黏板後開始調查，每週定期調查洋香瓜上銀葉粉蝨密度及 SLCPHV 之罹病率，至 5 月 28 日止。銀葉粉蝨密度監測調查以 10 個黃色黏板 (11 cm \times 15 cm) 逢機設置於試驗田中，每週回收後更新黏紙攜回室內，並計算黏紙上銀葉粉蝨成蟲的數量。並在試驗田區內每畦隨機取 5 個調查點，每一調查點觀察 5 株洋香瓜，以目視檢定幼葉是否出現病徵方式調查植株的罹病率。粉蝨是否帶病毒之檢測，則自田間調查帶回的黃色黏板，以蟲針挑取其上的銀葉粉蝨成蟲，樣品數為收回黏板上

粉蝨總蟲數之 10%，若該總數小於 50 隻，則黏板上的粉蝨全數進行 DNA 萃取，若總數的 10% 小於 50 隻，則以 50 隻為最低粉蝨 DNA 萃取數，以上述 PCR 方式檢測粉蝨帶毒率。帶毒粉蝨平均密度之估算則以當週黏板平均誘集成蟲總數及其個別引子對監測黏板上粉蝨帶毒率之乘積。

結果

雙生病毒基因體序列分析與引子設計

以植物 DNA 為模板，經過滾環式擴增法擴增，電泳分析可看到大分子量 DNA 產物 (圖 1A)，利用 begomoviruses 的 DNA-A 在 AV2 基因中共有一 BamHI 的特性，SLCPHV 之 DNA-B 有單一 HindIII 的特性。以 BamHI 或 HindIII 酶切後產生一大小約 2.7 kb DNA (圖 1B，HindIII 酶切圖未出示)，即為全長度 DNA-A 或 DNA-B。經選殖及定序分析，本試驗中採集感染洋香瓜的 SLCPHV 之 DNA-A 有 2,733 個核苷酸，感染番茄的 ToLCTWV 之 DNA-A 共有 2,740 個核苷酸，感染紫花藿香薊的 AYV 之 DNA-A 共有 2,734 個核苷酸，感染聖誕紅的雙生病毒 DNA-A 有 2,732 個核苷酸，經序列比對與木瓜上的 PaLCGDV 鞘蛋白基因 (Acc. No. AY183472) 有 93.5% 的相同度。SLCPHV 之 DNA-B 有 2,717 個核苷酸。

台灣地區有紀錄感染瓜類的豆類黃金嵌紋病毒屬病毒包含 SLCPHV 與 ToLCNDV 2 種，ToLCNDV 曾發生於宜蘭的東方型甜瓜，因未採到 ToLCNDV 的樣本，因此試驗中僅以 SLCPHV 進行。比較試驗中定序之 SLCPHV 與 GenBank 登錄之 SLCPHV 與 ToLCNDV 各分離株之基因體與各別基因核苷酸之相同度，結果如表 2。雖然 SLCPHV 與 ToLCNDV 各基因間以鞘蛋白基因 (AV1) 的相同度最高，但在各病毒之間亦以鞘蛋白基因相同度最高，來避免專一性引子增幅感染瓜類的豆類黃金嵌紋病毒以外病毒，造成誤判。另選擇 AV2 基因附近差異大的區域設計專一性引子，這對引子只與 SLCPHV 及 ToLCNDV 反應，不與其他 begomoviruses 反應。

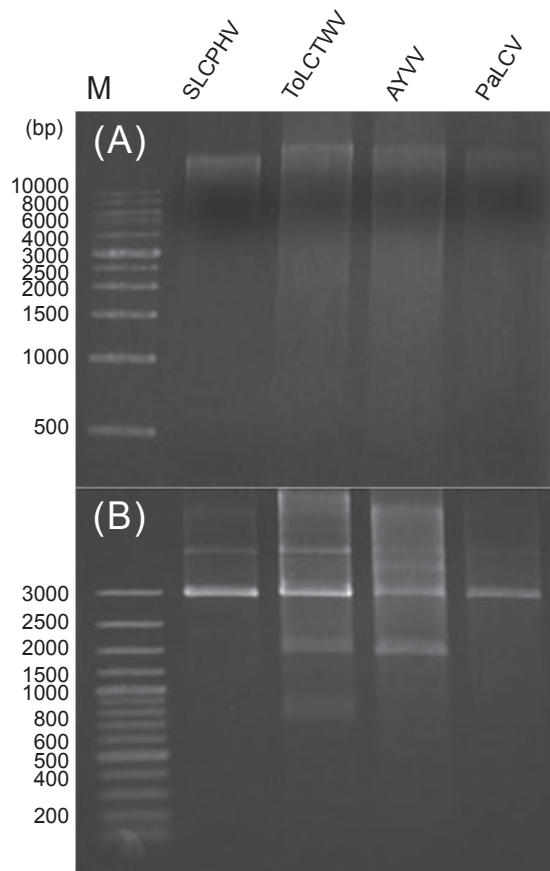


圖 1. 電泳分析已感染雙生病毒之植株 DNA 為模板進行滾環式擴增法之產物 (A) 及產物以 BamHI 酶切之結果 (B)。

Fig. 1. Gel photograph showing (A) high molecular weight DNA fragment obtained by RCA of the infected samples and (B) RCA products digested with BamHI.

CP1up/dw 與 SLCVup/dw 兩引子在不同瓜類作物上的 SLCPHV 偵測之比較

以 CP1up/dw 偵測確認帶有 SLCPHV 之瓜類植株病毒，在聚合酶連鎖反應後，以 1.2% 瓊脂糖凝膠電泳確認結果 (圖 2)，皆可在約 500 bp 左右的位置，有明顯的預期條帶出現 (圖 2A)。在 SLCVup/dw 方面，則可以在 200–300 bp 之間，有明顯的條帶出現 (圖 2B)。結果顯示，以 CP1up/dw 與 SLCVup/dw 兩引子對皆可以在不同瓜類作物上的檢測到 SLCPHV。

表 2. 台灣地區感染瓜類的豆類黃金嵌紋病毒屬病毒基因體與各別基因核苷酸相同度之比較。

Table 2. Comparison of whole genome and similarity of individual genes of cucurbit infected with begomoviruses in Taiwan.

Virus	Isolate	DNA-A							DNA-B		
		WG ^z	AV1	AV2	AC1	AC2	AC3	AC4	WG	BV1	BC1
SLCPHV	TS	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	YL	98.2	98.8	98.6	98.3	98.0	97.8	98.8	97.3	97.6	98.3
	1-1	98.4	99.4	98.3	98.4	94.5	98.5	98.8	97.7	98.4	85.1
	PA1	98.6	99.4	80.8	98.4	98.5	99.0	99.2	-	-	-
	AFPK5slv	98.5	99.2	80.3	98.7	99.3	98.5	98.1	-	-	-
	Wg1	98.1	99.0	98.8	97.9	97.8	97.8	98.4	-	-	-
ToLCNDV	OM	82.8	89.4	71.7	80.1	87.7	86.6	58.1	65.9	69.9	78.7

^z Sequences of Whole genome. Accession number of *Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV) isolate YL DNA-A (EU479710), DNA-B (EU479711), isolate 1-1 DNA-A (JF146795), DNA-B (JF746196), isolate PA1 DNA-A (DQ866135), isolate AFPK5slv (EF199774), isolate Wg1 (EU310406), isolate TS (this study), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) DNA-A (GU180095), DNA-B (GU180096).

CP1up/dw 與 SLCVup/dw 兩引子在罹有雙生病毒的不同植株上之比較

在已感染不同雙生病毒植株及帶病毒粉蝨上，以 CP1up/dw 與 SLCVup/dw 兩引子對偵測結果如圖 3 所示。在植株方面，以 CP1up/dw 偵測結果，在洋香瓜、蕃茄、藿香薊及聖誕紅等皆可以增幅出約 500 的片段，惟聖誕紅部分增幅出的條帶亮度較淡。在 SLCVup/dw 方面，只有洋香瓜可以增幅出 200–300 bp 的預期片段 (圖 3A)。在粉蝨方面，以 CP1up/dw 引子檢測經由 4 種帶毒植株餵食處理的粉蝨，皆可以增幅出約 500 bp 大小的片段；在 SLCVup/dw 方面，只有洋香瓜捲葉病株餵食處理之蟲體可以增幅出 200–300 bp (圖 3B)。除此之外，在植株方面，以 CP1up/dw 增幅結果，聖誕紅帶病植株約在 1 kb 處多產生 1 條亮度較淡的條帶；以 SLCVup/dw 增幅結果，只有帶病毒的聖誕紅植株可增幅出 1 條大小約 1.2 kb 亮度較淺的條帶，這部分推估應來自聖誕紅植株本身 DNA。在粉蝨蟲體部分，SLCVup/dw 在 4 種帶毒植株上，皆可增幅出大小約 300–400 bp 的條帶，推測應來自於粉蝨本身蟲體上的 DNA 所造成的背景值。結果顯示，SLCVup/dw 可以鑑別出同 *Begomovirus* 屬、不同種之病毒，以達到鑑別南瓜捲葉病之高度專一性的需求。

田間粉蝨成蟲帶毒率之檢測

洋香瓜自定植後粉蝨發生密度由平均每 1 黏紙 3 隻逐漸增加，2010 年至 5 月 21 日平均為 1,224 隻 (表 3)。在粉蝨帶毒率檢測部分，本試驗以黏板誘集的粉蝨蟲體萃取出 DNA 進行 PCR 檢測是否帶 SLCPHV 或 TYLCNDV，結果顯示 (表 3) 在二畝試驗田所收集黏板上粉蝨成蟲的帶毒率，以 CP1up/dw 檢測之結果在 (4 月 8–14 日) 粉蝨帶毒率為 32%，之後帶毒率隨天數下降，至 5 月 28 日為 5.4%；以 SLCVup/dw 檢測結果，粉蝨帶毒率自 4 月 8 日開始為 8.0–15.0%，至 5 月 21 日後降為 6.0%，最低為 5.4%。利用所得粉蝨帶毒率分別估算田間帶南瓜捲葉病毒之平均密度，以 CP1up/dw 檢測結果估算以洋香瓜定植後調查至試驗結束為平均每 1 黏板 0–43.3 隻；以 SLCVup/dw 檢測結果估算為平均每 1 黏板 0–73.4 隻，以 5 月 21 日帶毒粉蝨數量最多。

洋香瓜植株罹病率，試驗區自 2010 年第 1 期調查結果顯示 (表 3)，洋香瓜自栽植後 4 wk (4 月 21 日)，約有 22.4% 植株罹病，且隨洋香瓜生長而逐漸增加，至 5 月 21 日時罹病率達 34.4%。

討論

表 1 比較試驗中定序之 SLCPHV TS 分

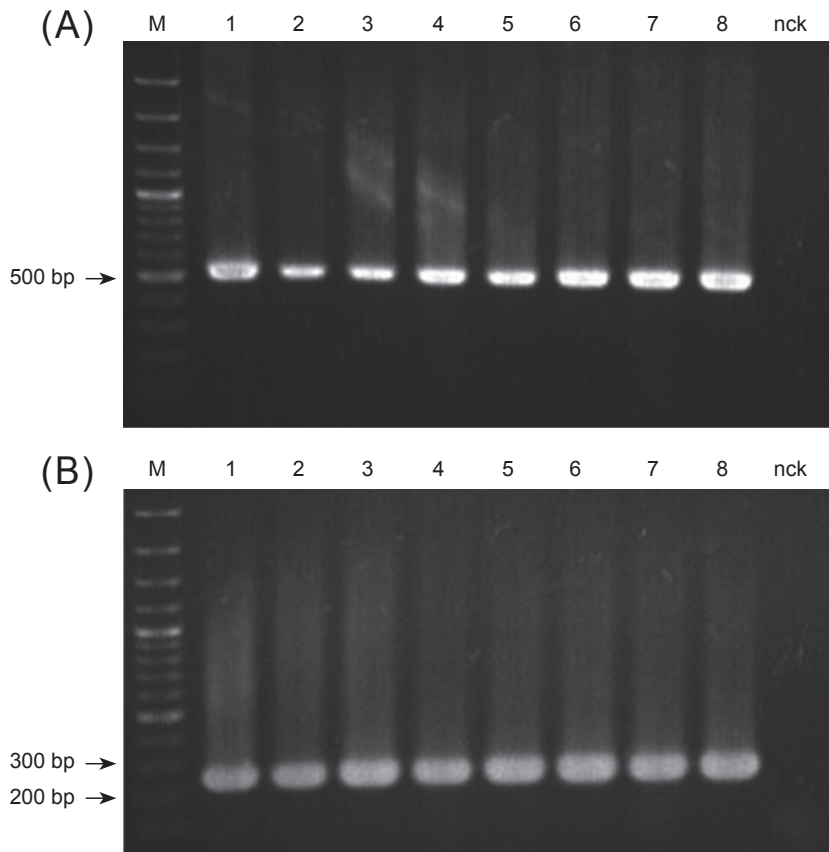


圖 2. 利用 (A) CP1up/dw 與 (B) SLCVup/dw，分別對罹有南瓜捲葉病之瓜類植株 DNA 進行 PCR，其產物經電泳分析結果。(1：洋香瓜；2：西瓜；3：甜瓜；4：哈密瓜；5：扁蒲；6：南瓜；7：胡瓜；8：冬瓜；nck：水；M：marker)。

Fig. 2. Agarose gel analysis showing the amplification products obtained by PCR with CP1up/CP1dw (A) and SLCVup/dw (B). Detection of SLCV from different SLCV-infected cucumber plants by PCR. Lane 1: *Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud.; Lane 2: *Citrullus lanatus*; Lane 3: *Cucumis melo* L. var. *makuwa* Makino; Lane 4: *Cucumis melo* var. *saccharinus*; Lane 5: *Langenaria siceraris* Standl.; Lane 6: *Cucurbitamoschata*; Lane 7: *Cucumis stauvus* L.; Lane 8: *Beninacasa hispida*; Lane nck: no DNA control (negative control); and Lane M: 100 bp ladder DNA maker.

離株與 GenBank 登錄之台灣記錄感染瓜類的豆類黃金嵌紋病毒屬病毒 SLCPHV 與 ToL-CNDV 各分離株間之基因體與各別基因核苷酸之相同度，SLCPHV 6 分離株的 DNA-A 基因體相同度高於 98.1%，DNA-B 的 3 分離株之基因體相同度高於 97.3%，但個別基因因預測位置不同，使基因大小不同，如分離株 PA1 與 AFPKslv 之 AV2 基因與分離株 1-1 之 BC1 基因，因而降低其相同度之比值。

在台灣有紀錄可藉由銀葉粉蝨傳播的雙生病毒有 6 種，此 6 種病毒之寄主範圍包括茄科作物 (如：番茄、煙草) (Tsai *et al.* 2011)、瓜

類作物 (Liao *et al.* 2007; Tsai *et al.* 2007)、豆科作物、木瓜、藿香薊、馬櫻丹、洋桔梗及雜草 (葵錦科藿香薊屬) 等皆是常見於田間或園藝觀賞的植株 (Cheng *et al.* 2007)。調查田區附近若有這些作物，以 CP1up/dw 對田間銀葉粉蝨與洋香瓜植株組織進行病毒偵測，容易會有高估誤判的情形。在試驗結果顯示 (圖 3)，若以原有 CP1up/dw 偵測田間洋香瓜上粉蝨，則無法明確將 SLCPHV 區分出來。以 SLCVup/dw 偵測，則可以明顯將 SLCPHV 與其他雙生病毒區分出來。

此外，在田間粉蝨帶毒率偵測試驗過程

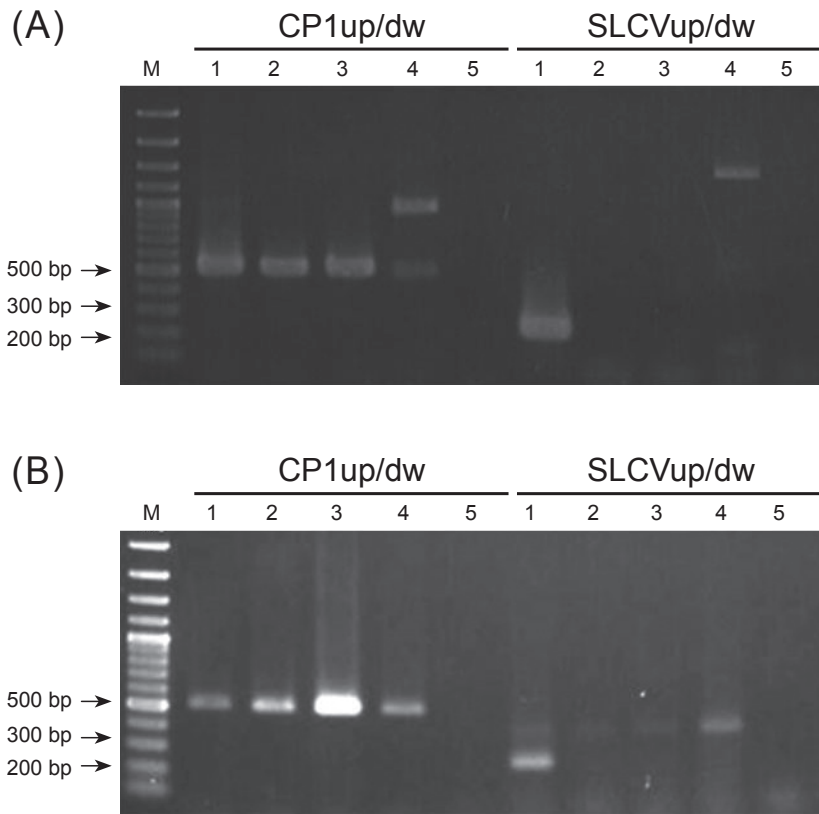


圖 3. 利用 CP1up/dw 與 SLCVup/dw 引子對進行聚合酶連鎖反應，檢測已感染雙生病毒之植株 (A) 與取食過感病植株之粉蝨 (B)，其增幅產物之電泳圖。(bp: marker; 1: 洋香瓜; 2: 蕃茄; 3: 藿香薊; 4: 聖誕紅; 5: 水)。

Fig. 3. Agarose gel analysis showing the amplification products obtained by PCR with CP1up/dw and SLCVup/dw. Detection of *begomovirus* from virus-infected plant leaf tissue (A) and whitefly fed on the virus-infected plant (B) by PCR. Lane 1: squash; Lane 2: tomato; Lane 3: ageratum; Lane 4: poinsettia; Lane 5: no DNA control (negative control); and Lane M: 100 bp ladder DNA maker.

中，觀察到 2 對引子皆有檢出的粉蝨 DNA 樣本，CP1up/dw 所增幅出的條帶亮度也普遍比 SLCVup/dw 來的低，推測可能因 CP1up/dw 增幅的產物分子量高於 SLCVup/dw 的產物，也是造成 2010 年 4 月 30 日-5 月 21 日 CP1up/dw 檢出率低於 SLCVup/dw 的原因。在第 1 期 4 月 8-21 日的帶毒率結果 CP1up/dw 檢出率比 SLCVup/dw 來得高，推測可能因田間雜草帶有雙生病毒或者是誘引到田區外帶有雙生病毒的銀葉粉蝨所導致。

以簡併式引子對 (CP1up/dw) 與專一引子對 (SLCVup/dw) 檢測所得估算田間帶毒粉蝨

密度，與田間洋香瓜罹病率之趨勢比對，判別兩個引子對監測或預測帶毒粉蝨族群靈敏度及準確度。試驗田區的罹病率自植株定植後呈現逐漸增加的趨勢 (表 3)，至定植後 8 wk (5 月 21 日) 罹病率最高達 34.4%，以 SLCVup/dw 檢測之結果估算田間帶毒粉蝨之密度亦呈現逐漸增高之趨勢，密度最高亦發生在 5 月 21 日；以 CP1up/dw 檢測之結果估算之族群增長之趨勢則與罹病率較不一致，族群密度最高峰較罹病率晚 1 wk (表 3)。故未來以 SLCVup/dw 檢測瓜類雙生病毒檢測及監測帶毒粉蝨之發生，較簡併式的引子對具有更高之靈敏度及準確度。

表 3. 二崙地區洋香瓜田間銀葉粉蝨發生密度及 SLCPHV 罹病率。

Table 3. Incidence rate of whitefly and severity of SLCPHV in cantaloupe field at Erlun, Yunlin County, Taiwan.

Date in 2010	Density of whitefly (Adult/trap) ^z	Rate of viruliferous whitefly (%)		Severity of SLCPHV in field (%)	Number of viruliferous whiteflies (Adults/trap)	
		CP1up/dw	SLCVup/dw		CP1up/dw	SLCVup/dw
Apr. 2	3 ± 0.6	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
Apr. 8	6 ± 1.6	32.0	8.0	1.1	2.0	0.5
Apr. 14	20 ± 0.8	32.0	8.0	1.0	6.3	1.6
Apr. 21	44 ± 4.7	18.0	14.0	22.4	8.0	6.2
Apr. 30	102 ± 15.8	5.0	15.0	28.2	5.1	15.4
May 21	1224 ± 143.3	2.0	6.0	34.4	24.5	73.4
May 28	809 ± 179.7	5.4	5.4	22.6	43.3	43.3

^z Mean ± SEM.

然而愈接近生長後期，其他瓜類病害愈易發生交互感染，如白粉病、萎凋病、西瓜銀斑病、甜瓜黃斑病、缺綠黃化病、果斑病、洋香瓜黑點根腐病等等病害陸續發生，造成部分洋香瓜植株死亡，影響罹病率計算，為導致 5 月 28 日罹病率的下降的因素之一（表 3）。除此之外，在罹病率觀察中，影響南瓜捲葉病病害病徵的判斷除了個人主觀判斷的人為因素外，田間的其他病害發生，造成植株受到多種病害感染。若其他病害病徵表現在瓜葉上，將影響南瓜捲葉病的病徵表現，如瓜類萎凋病或者多種病毒複合感染，則會影響洋香瓜南瓜捲葉病病徵的辨別，故利用分子生物鑑定法來檢測感病率即可克服此等問題。

引用文獻

- Chang, H. H., H. M. Ku, W. S. Tsai, R. C. Chien, and F. J. Jan. 2010. Identification and characterization of a mechanical transmissible *begomovirus* causing leaf curl on oriental melon. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:219–228.
- Chang, L. S., Y. S. Lee, H. J. Su, and T. H. Hung. 2003. First report of *Papaya leaf curl virus* infecting papaya plants in Taiwan. *Plant Dis.* 87:204.
- Cheng, Y. H., C. C. Chen, Z. Y. Wang, and C. A. Chang. 2007. Whitefly-transmitted geminiviruses in ornamental plants in Taiwan. p.269–278. *in: Proceeding of 2007 Symposium on Plant Vector-Borne Disease and Control Strategies.* October 26, 2007. Taichung, Taiwan. National Chung Hsing University. Taichung. (in Chinese with English abstract)
- Chung, M. L., C. H. Liao, M. J. Chen, and R. J. Chiu. 1985. The isolation, transmission and host range of sweet potato leaf curl agent in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 27:333–341. (in Chinese with English abstract)
- Deng, T. C. 2011. Evolutionary change of trends in prevalence of cucurbits-infecting viruses in Taiwan, 1981–2011. p.147–163. *in: Proceedings of the Symposium on Integrated Management Technology of Insect Vectors and Insect-Borne Diseases.* July 15, 2011. Taichung, Taiwan. Special Publication of Taiwan Agric. Res. Inst. Taichung. (in Chinese with English abstract)
- Fauquet, C. M., R. W. Briddon, J. K. Brown, E. Moriones, J. Stanley, M. Zerbini, and X. Zhou. 2008. Gemini-virus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.* 153:783–821.
- Inoue-Nagata, A. K., L. C. Albuquerque, W. B. Rocha, and T. Nagata. 2004. A simple method for cloning the complete *begomovirus* genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *J. Virol. Methods* 116:209–211.
- Jan, F. J., S. K. Green, S. L. Shih, L. M. Lee, H. Ito, J. Kimbara, K. Hosoi, and W. S. Tsai. 2007. First report of *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* in Taiwan. *Plant Dis.* 91:1363.
- Jones, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:195–219.
- Liao, J. Y., C. C. Hu, T. K. Lin, C. A. Chang, and T. C. Deng. 2007. Identification of Squash leaf curl Philippines virus on *Benincasa hispida* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16:11–18. (in Chinese with English abstract)
- Lin, F. C., S. C. Chang, Y. H. Cheng, C. L. Wang, and C. C. Hu. 2011. Silverleaf whitefly vector for geminiviruses on vegetables and their control. p.193–203.

- in*: Proceedings of the Symposium on Integrated Management Technology of Insect Vectors and Insect-Borne Diseases. July 15, 2011. Taichung, Taiwan. Special Publication of Taiwan Agric. Res. Inst. Taichung. (in Chinese with English abstract)
- Lin, F. C., T. H. Su, and C. L. Wang. 1997. Effect of temperature on development and reproduction of silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii*) and its population fluctuation on poinsettia. Chinese J. Entomol. 17:66–79. (in Chinese)
- Tsai, M. C., C. S. Liu, and H. J. Su. 1997. Poinsettia leaf curl, a new disease caused by a geminivirus. J. Phytopathol. 145:347–350.
- Tsai, W. S., S. L. Shih, S. K. Green, and F. J. Jan. 2007. Occurrence and molecular characterization of *Squash leaf curl Phillipines virus* in Taiwan. Plant Dis. 91:907.
- 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.
- Wu, C. Y., Y. C. Lai, N. S. Lin, Y. H. Hsu, H. T. Tsai, J. Y. Liao, and C. C. Hu. 2008. A simplified method of constructing infectious clones of *begomovirus* employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. J. Virol. Methods 147:355–359.
- Wyatt, S. D. and J. K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology 86:1288–1293.

Development of Primers for Detection of Whiteflies Carrying Leaf Curl Disease: Causing Agents

Ying-Huey Cheng¹, Han-Chao Lin², and Feng-Chyi Lin^{3,*}

Abstract

Cheng, Y. H., H. C. Lin, and F. C. Lin. 2015. Development of primers for detection of whiteflies carrying leaf curl disease: Causing agents. *J. Taiwan Agric. Res.* 64(2):135–144.

A viral disease caused by *Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV), a begomovirus transmitted by *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, is one of the most popular and serious diseases in muskmelon cultivation during the last decade in the central and southern Taiwan. In addition to SLCPHV, there are many begomoviruses transmitted by whitefly in Taiwan. Polymerase chain reaction (PCR) assay with degenerated primers has been widely used for general detection of begomoviruses. The degenerated primer pairs CP1up/dw were designed based on the capsid protein gene of recorded begomoviruses in Taiwan and could amplify the viral DNA fragment of ca. 500 bp. The other degenerated primer pairs SLCVup/dw were designed to specifically target capsid protein gene of SLCPHV and *Tomato leaf curl New Dali virus*, i.e., two causing agents of squash leaf curl disease in Taiwan, and could amplify the viral DNA fragment of ca. 250 bp. In field survey of whitefly infection rate, results indicated that detection with CP1up/dw resulted in higher positive ratio than SLCVup/dw. Viruliferous whiteflies could be detected with primer pairs CP1up/dw rather than with SLCVup/dw. Results showed that whitefly carried other *begomovirus* instead of SLCPHV. Comparison with CP1up/dw, the primer pairs SLCVup/dw possessed higher sensitivity and accuracy and therefore, they were more suitable for inspection of squash leaf curl disease and infection rate of *B. argentifolii*.

Key words: *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, *Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV), *Cucurbitis*, Primer.

Received: August 7, 2014; Accepted: December 29, 2014.

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

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

² Research Assistant, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.