台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(1):46–64 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202003_69(1).0004

研究報告

夜香花嵌紋病毒百香果分離株分子特性及廣效性分子檢測技術之開發應用

李文立[1] Chinnapan Thanarut[2] 徐智政[3] 李國基[4] 江芬蘭[5] 陳金枝[6,*]

摘要

李文立、Chinnapan Thanarut、徐智政、李國基、江芬蘭、陳金枝。2020。夜香花嵌紋病毒百香果分離株分子特性及廣效性分子檢測技術之開發應用。台灣農業研究 69(1):46–64。

本研究以細菌生合成系統誘導表現之夜香花嵌紋病毒 (*Telosma mosaic virus*; TeMV) 鞘蛋白 (coat protein; CP) 作為抗原，製備出具有廣效檢測 TeMV、*East Asian passiflora virus* (EAPV)、*Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV)、*Bean yellow mosaic virus* (BYMV) 及 *Soybean mosaic virus* (SMV) 等馬鈴薯 Y 屬病毒之多元抗體。針對台灣百香果 TeMV-DC6 分離株對應其全長度基因體核酸序列，共解得 10,022 個核苷酸，於 GenBank 登錄序號為 MN316594。2017–2019 年期間，利用所研製之 TeMV 多元抗體與引子對，調查台灣田間百香果之 TeMV 發生率大約 32.1–35.8%；而由泰國採集之 17 個葉片嵌紋與果實木質化的樣品，TeMV 檢出率為 100%。台灣及泰國百香果田間所收集之 TeMV 分離株，與泰國已發表之百香果 TeMV (AM409188) 之間的 CP 胺基酸序列，相同度均高達 90% 以上；但不同地理位置所分離到的百香果 TeMV 分離株在類緣演化上具有差異性，TeMV-DC6 等 9 個台灣分離株自成一類群，與 17 個泰國分離株有所區隔。依據台灣和泰國 TeMV 分離株設計 3 組引子對，以 RT-PCR 法檢測兩地之田間百香果 TeMV 罹病組織，在受測 67 個台灣分離株和 17 個泰國分離株中，台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d) 可檢出所有受測的台灣分離株及 9 個泰國分離株；而泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 僅檢出 12 個泰國分離株，且無法檢出全部的台灣分離株；由台灣泰國廣效性引子對 (TwTha840u/TwTha840d) 則可檢出全部受測的台灣和泰國分離株。本研究結果顯示，目前台灣和泰國百香果之 TeMV 發生概況，並首度完成台灣分離株 TeMV-DC6 之全長度基因體核酸序列之定序，釐清台灣與泰國 TeMV 不同分離株之類緣差異性，並開發可廣效性檢測台灣和泰國百香果 TeMV 分離株之引子對，可提升對不同來源 TeMV 之檢測效率。

關鍵詞：百香果、夜香花嵌紋病毒、多元抗體、全長度核酸序列、RT-PCR 廣效性檢測。

前言

百香果 (*Passiflora* spp.) 原產於南美巴西，為熱帶亞熱帶週年生果樹。百香果為具有高經濟價值與廣被多元利用的果樹，素有「果汁之王」和「水果藥王」美稱，在全球果汁工業上具有重要地位。百香果栽培過程中容易遭受病毒、真菌、蟲害等危害，尤以引起木質化徵狀之病毒影響百香果生育及產值最鉅 (Liberato & Zerbini 2019)，更是種苗貿易流通時被檢視的檢疫病原對象。台灣商業化栽培百香果已超過 30 年，以每年全園換植健康種苗，施行

投稿日期：2019 年 9 月 7 日；接受日期：2019 年 10 月 24 日。
* 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所研究員兼分所長。台灣 高雄市。
[2] 清邁大學農業生產學院講師。泰國 清邁市。
[3] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員。台灣 高雄市。
[4] 農委會科技處技術服務科科長。台灣 台北市。
[5] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[6] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

一年生栽培方式有效地控管百香果病毒病害，並創造了百香果種苗產業的貿易經濟效益。

國際間百香果的病毒種類，紀錄上約有 20 種，涵蓋 *Carlavirus*、*Cucumovirus*、*Cilevirus*、*Nepovirus*、*Potyvirus*、*Rhabdovirus*、*Tobamovirus* 及 *Tymovirus* 屬之病毒 (Spiegel *et al*. 2007; Parrella & Lanave 2009; Coutts *et al*. 2011; Song & Ryu 2011; Liberato & Zerbini 2019)。亞洲地區已知百香果病毒種類，包括 (1) 2 種東亞百香果病毒 (*East Asian passiflora virus*; EAPV) 類群：EAPV-AO 類群主要引起葉片嵌紋和果實木質化 (Iwai *et al*. 2006a)；EAPV-IB 分離株類群引起斑駁或輕微嵌紋病徵 (Fukumoto *et al*. 2012)；(2) 豇豆蚜傳嵌紋病毒 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*; CABMV)，即前稱在台灣引起漣葉徵狀的百香果漣葉病毒 (*Passionfruit crinkle virus*; PCV) (Chang & Lin 1989)，近十多年來，未再於台灣百香果上發現此病毒；(3) 胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 引起葉片黃斑病徵 (Liberato & Zerbini 2019)；(4) 夜香花嵌紋病毒 (*Telosma mosaic virus*; TeMV) 為近年於泰國百香果上發現的病毒 (Chiemsombat *et al*. 2014)，引起葉片嵌紋、果皮嵌紋和木質化病徵；(5) 2 種 *Begomovirus* 屬病毒：包含聖誕紅捲葉病毒 (*Euphorbia leaf curl virus*; EuLCV) 及木瓜捲葉廣東病毒 (*Papaya leaf curl Guangdong virus*; PaLCuGDV)，首次由台灣學者報導可發生於百香果 (Cheng *et al*. 2014)，常伴隨於寒流低溫氣候下發病而引起葉片嵌紋皺縮，氣溫回暖後新生的葉片恢復無病徵。EuLCV 在中國大陸、台灣和南韓均有發生，2004 年在中國聖誕紅被發現 (Ma *et al*. 2004)；南韓也報導 EuLCV 可感染百香果和木瓜 (Kil *et al*. 2016)。而 PaLCuGDV 於 2004 年由中國大陸學者首次報導 (Wang *et al*. 2004)，因此在中國大陸和台灣均有發生。

國外已報導之其他百香果病毒種類 (Fischer & Rezende 2008; Parrella & Lanave 2009; Baker et al. 2014; Liberato & Zerbini 2019)，包括 *Potyvirus* 屬之 *Passiflora chlorosis virus* (PaCV)、*Passiflora virus* Y (PaVY)、*Soybean mosaic virus* (SMV)、*Bean yellow mosaic virus* (BYMV) 和 *Passion fruit woodiness virus* (PWV)；*Tobamovirus* 屬之 *Tobacco mosaic virus* (TMV)、*Maracuja mosaic virus* (MarMV) 及 *Passion fruit mosaic virus* (PafMV)；*Rhabdoviridae* 科 *Cilevirus* 屬之 *Passion fruit green spot virus* (PGSV) 及 *Rhabdovirus* 屬之 *Passion fruit vein clearing virus* (PVCV)；*Carlavirus* 屬之 *Passiflora latent virus* (PLV)；*Nepovirus* 屬之 *Tomato ringspot virus* (ToRSV)；*Tymovirus* 屬之 *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV)，及 *Begomovirus* 屬之 *Passion flower little leaf mosaic virus* 和 *Jatropha mosaic virus*。

木質化病毒為影響百香果生育之主要病毒，目前國際間引起百香果木質化的病毒種類包括澳洲的 PWV (Wylie & Jones 2011)、巴西的 CABMV (Nascimento *et al*. 2006)、泰國的 TeMV (Chiemsombat *et al*. 2014)；而日本、台灣、中國大陸和東南亞等亞洲地區主要為 EAPV 感染所引起 (Iwai *et al*. 2006b; Chong *et al*. 2018)。引起台灣嚴重型木質化病徵之主要病徵為 EAPV 的 AO 系統 (Chang *et al*. 2017; Chong *et al*. 2018)。

TeMV 為 *Potyvirus* 屬病毒，首次由 Ha *et al*. (2008) 發表可感染夜香花 (*Telosma cordata*) 引起嵌紋病徵；泰國學者於 2014 首次發表其可引起百香果植株葉片嵌紋及果實木質化徵狀 (Chiemsombat *et al*. 2014)。近年來亞洲地區陸續發現 TeMV 發生於百香果，包括中國大陸 (Xie *et al*. 2017; Chen *et al*. 2018c; Yang *et al*. 2018) 和作者於 2017 年 11 月鑑定出台灣百香果之 TeMV，並通報行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 (https://phis.baphiq.gov.tw/WebEvery.nsf/AttachFileView/36DCDBCA374F9E1B482581E700111112Form0?OpenDocument&page=Center)；同時期，台灣學者 (Chen *et al*. 2018a; Tsai *et al*. 2018) 於 2017–2018 年期間發表百香果上發生此病毒。文獻紀錄上 TeMV 的寄主包括有夜香花 (Ha *et al*. 2008)、廣藿香 (*Pogostemon cablin*) (Noveriza *et al*. 2012)、翼柄決明 (*Senna alata* L.) (Yao *et al*. 2019) 和百香果 (Xie *et al*. 2017; Chen *et al*. 2018c; Yang *et al*. 2018)。

本研究利用細菌生合成系統表達 TeMV-

CP 作為抗原，以製備病毒之多元抗體分析台灣和泰國 TeMV 分離株之鞘蛋白核酸類緣關係，以及設計核酸引子對實用於百香果 TeMV 病毒之檢測鑑定，以提升對國際間不同來源 TeMV 之檢測鑑定之準確度。另外，首次完成百香果 TeMV 台灣分離株之全長度基因體的核酸定序與比對分析。

材料與方法

病毒及罹病組織

台灣來源之百香果罹病組織

本研究採用 2017–2019 年期間，由國內的南投埔里及台中霧峰區和后里區田間檢出 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 之百香果葉片組織，於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 中，可與台灣分離株所設計的 TeMV 引子對 (TwTe650u/TwTe650d) (表 1) 反應者進行試驗；其中代號 DC6 罹病組織接種於奎藜 (*Chaenopodium quinoa*) 進行 3 次單斑分離，獲得 TeMV-DC6 之純系分離株。將此分離株接種於黃百香果造成嵌紋徵狀 (圖 1B)，隨後取 TeMV-DC6 罹病葉片進行病毒全長度基因體核酸選殖與定序試驗。相關百香果罹病組織和奎藜單斑罹病葉片浸漬於 50% (v/v) 甘油中，保存於 -20℃下供後續試驗所需。

泰國來源之百香果罹病組織

2019 年 3 月於泰國之曼谷 (Bangkok)、清邁 (Chiang Mai) 和清萊 (Chiang Rai) 等地之百香果田區採取葉片嵌紋徵狀者 (圖 1C–1D、圖 1E–1F)，樣品乃透過行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之「特定植物檢疫物及物品輸入辦法」核准輸入 (輸入許可證號 108-V-500)，於隔離管制規範條件下進行病毒鑑定之相關試驗。試驗完畢依規定以高溫高壓滅菌法 (121℃、20 min) 將材料進行消毒與銷毀。

細菌生合成系統表現 TeMV-CP 及其多元抗體製備

本試驗於 2016 年國內尚未發現 TeMV 時，參考 GenBank 已登錄之泰國百香果 TeMV 鞘蛋白基因 (coat protein gene; TeMV-CP) 序列，委託波仕特生物科技股份有限公司 (台灣台北市) 進行其全長度 CP 核苷酸合成，並構築於 pET28a (+) 質體上 (Novagen, Inc., Madison, WI, USA)，質體代號為 pET-TeMVCP。所合成之核酸片段，包含有對應全長度 CP 之 816 個核苷酸 (nucleotide; nt) 及 CP 核苷酸終止碼 (TAA)、2 種限制酶切位 (5’ 端之 *Nco*I 和 3’ 端之 *Xho*I 切位)。

將 pET-TeMVCP 質體轉型於 *E. coli* strain Rosetta (DE3)，進行 TeMV-CP 之表現蛋白誘導與純化，相關試驗方法參照以往研究報告進行 (Chen *et al*. 2018b)。純化後的 TeMV-CP 表現蛋白，其抗原表現評估，於西方墨點法中以市售 *Potyvirus* 屬單元抗體 (Agdia Inc. Elkhart, IN, USA) 確認之，西方墨點法試驗步驟參照以往研究報告進行 (Chen *et al*. 2018b)。

進一步選用確定有表現 TeMV-CP 之選殖株，進行大量表現蛋白之誘導與純化 (Li *et al*. 1998; Chen *et al*. 2018b)，將純化之表現蛋白濃縮為 1 mg mL^{-1} 以做為抗原，並送交濁水溪

表 1. 應用於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應以檢測 *Telosma mosaic virus* 之引子對序列。

Table 1. The primer pairs used for the detection of *Telosma mosaic virus* in reverse transcription-polymerase chain reaction.

Primer pair	Primer sequence	Annealing temp.	Amplicon (bp)
1. TwTe650u	5’GTTGAGCAACTCAAAAATC 3’ (19-mer)	52℃	650
TwTe650d	5’TTT TATTTGTAGTGCCAAC 3’ (19-mer)		
2. ThaTe430u	5’AGAAGCCTGGGGCCACACA 3’ (19-mer)	52℃	430
ThaTe430d	5’GCCTTTAACCATTGGAAGA 3’ (19-mer)		
3. TwTha840u	5’GAAAGTGCATTGAGAAAGC3’ (19-mer)	52℃	840
TwTha840d	5’CATCAATCCAAACATCTT 3’ (19-mer)		

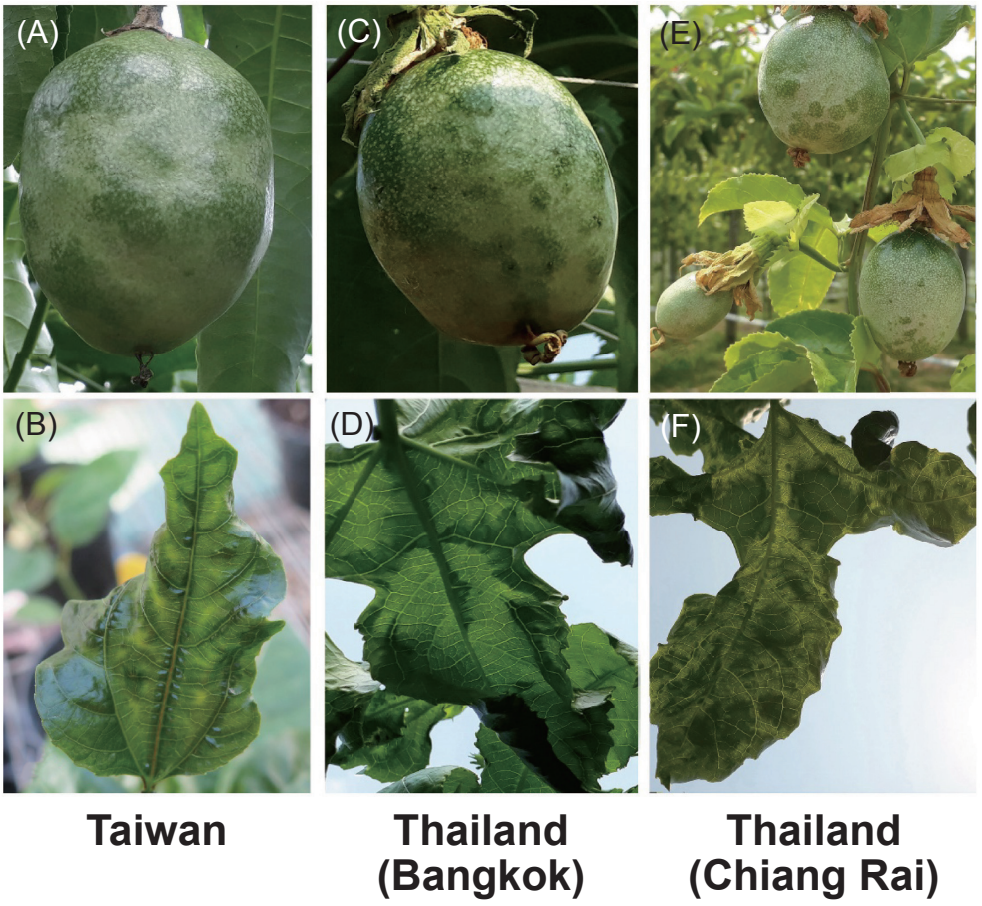


圖 1. 台灣和泰國田間百香果檢出受 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 感染之病徵。(A) 台灣罹病株果實著綠不均及木質化；(B) TeMV-DC6 接種於百香果葉片呈現嵌紋徵狀；(C、D) 泰國曼谷 (Bangkok) 和 (E、F) 泰國清萊 (Chiang Rai) 之田間罹病株果實木質化和葉片嵌紋病徵圖。

Fig. 1. Symptoms of *Telosma mosaic virus* (TeMV)-infected passiflora in the fields of Taiwan and Thailand. (A) Uneven greening and woodiness on an infected fruit and (B) TeMV-DC6 inoculated *Passiflora* sp. showing mosaic symptoms on leaves. Symptoms of woody fruits and mosaic leaves on diseased field passionfuit plants collected in (C, D) Bangkok and (E, F) Chiang Rai, Thailand.

生物科技有限公司 (台灣桃園市) 進行每週 1 次、連續 4 wk 的兔免疫注射以製備多元抗體。

TeMV-CP 多元抗體之檢測效果測試

本試驗參照 indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) 法 (Clark & Adams 1977; Chang *et al*. 1988; Chen *et al*. 2018b)，進行受測樣品與 TeMV-CP 多元抗體之反應。為評估本自製多元抗體之檢測效果，受測標準樣品，包括 2017–2018 年於國內田間百香果田採集之 9 個 TeMV 分離株，和本研究室保存之不同 *Potyvirus* 屬病毒罹病組織 (表 2)。其中，文獻紀錄上可感染百香果之 potyviruses，包括 EAPV、CABMV、BYMV 及 SMV (Fischer & Rezende 2008; Parrella & Lanave 2009)。取 0.1 g 之受測樣品組織進行免疫反應試驗，呈色反應以 150 μL/孔之比例加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-NPP) (Amresco, Solon Ind., Solon, OH, USA) 進行。反應 20 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃

表 2. 利用細菌表現 *Telosma mosaic virus* 鞘蛋白所製備的多元抗體於間接式酵素連結免疫吸附分析 (indirect-ELISA) 檢測不同 *Potyvirus* 屬病毒之效果。

Table 2. Detection effeciency of the polyclonal antibody produced with bacterial expressed coat protein of *Telosma mosaic virus* on various potyviruses in indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

Antigen[z]	ELISA reading (A_{405nm})[y]
Telosma mosaic virus (TeMV)-DC6	1.64
TeMV-DC3	1.27
TeMV-DC4	1.39
TeMV-DC33	0.41
TeMV-LSS18	1.42
TeMV-LSS30	1.38
TeMV-WFS1	1.42
TeMV-WFS2	1.89
TeMV-WFS4	1.72
East Asian passiflora virus (EAPV)-AO	0.86
East Asian passiflora virus (EAPV)-IB	1.13
Cowpea aphid born mosaic virus (CABMV)	0.54
Soybean mosaic virus (SMV)	0.70
Bean yellow mosaic virus (BYMV)	0.38
Lily mottle virus (LiMV)	0.50
Turnip mosaic virus (TuMV)	0.20
Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	0.46
Ornithogalum mosaic virus (OrMV)	0.47
Butterfly flower mosaic virus (BFMV)	0.38
Potato virus Y (PVY)	0.57
Basella rugose mosaic virus (BarMV)	0.30
Dasheen mosaic virus (DMV)	0.89
Konjac mosaic virus (KoMV)	0.44
Zantedeschia mild mosaic virus (ZaMMV)	0.50
Papaya ringspot virus (PRSV)	0.63
Positive control (BEP)	1.87
Healthy control threshold	0.21

[z] Tested potyviruses are stock materials in the laboratory. Nine TeMV isolates were collected from passiflora fields during 2017–2018 in Taiwan.

[y] The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with ELISA readings lower than the healthy control threshold were considered undetectable by indirect ELISA. Positive control is the bacterial expressed TeMV-CP (BEP).

度高低之依據。樣品吸光值大於 2× 之健康葉片吸光值者，判讀為正反應。

病毒 3’ 端核酸片段之定序分析

本試驗針對 9 個台灣分離株和 17 個泰國分離株進行病毒 3’ 端核酸片段之定序分析 (表 3)，步驟如下：

核酸純化：取 0.1 g 之受測罹病組織樣品，依據商業化植物核酸微量萃取試劑組 (Plant Total RNA mini Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corparation, Taipei, Taiwan) 之步驟，進行供試植物組織樣品全量核醣核酸 (total RNA) 之萃取。

單步驟 RT-PCR 法：以純化所得之 RNA 為模板，以 *Potyvirus* 屬病毒之簡併式引子對 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ (5’ATGATHGARKCNTGGGG3’/5’GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT3’) (Pappu *et al*. 1998; Chen *et al*. 2006) 進行病毒基因體 3’ 端約 1.3 kbp 核酸片段之單步驟 RT-PCR 反應。RT-PCR 依據試劑組 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 之配方，於每一 25 μL 反應液中分別加入 1 μL 之全量 RNA、12.5 μL 之 2× Reaction Mix、0.5 μL 之 SuperScript III RT-/Platinum Taq Mix、各 1 μL 之 10 μM 上游和下游引子和 9 μL 之 DEPC-treated water。所有試劑混合均勻後，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Germany) 中進行。設定反應程序為：50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 2 min；之後進行 26 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min、52℃下煉合 50 s，72℃下聚合 1 min 30 s，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

核酸片段選殖和核苷酸序列分析：以 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ 引子對所增幅出的 1.3 kbp 核酸片段，選殖於 pGEM-T Easy Vector Systems 載體上 (Promaga, Madison, WI, USA)，篩選出含有此特定嵌入序列 (insert sequence) 選殖株送交核酸定序公司 (明欣生物科技有限公司，台灣台北市)，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列，進行核酸選殖與定序分析。所得序列以 Vector NTI Suite (InforMax Inc., Bethesda, MD, USA) 分析軟體進行分析，並

表 3. 不同來源的 *Telosma mosaic virus* 百香果分離株之鞘蛋白核酸與胺基酸序列相同度比較表。

Table 3. Sequence identities of the nucleic acid and deduced amino acid between the coat protein (CP) gene of the *Telosma mosaic virus* (TeMV) Thailand isolate Pangda 15 from *Passiflora* sp. to that of those TeMV isolates available in GenBank.

			% Identity[y]	
Acc. No.[z]	Source & isolate	Length of CP nts	CP-nt	CP-aa
AM409188	Thailand/Pangda15	816	100.0	100.0
NC_009742	Vietnam/Hanoi	816	86.0	89.0
MH137276	China/YN1	816	87.6	90.1
KJ789129	China/GX1	816	91.1	94.5
MG944249	China/PasFru	816	92.2	94.5
MN316594	Taiwan/DC6	816	91.4	93.8
MH500098	Taiwan/DC3	816	90.9	93.0
MH500099	Taiwan/DC4	816	91.3	93.8
MH500101	Taiwan/DC33	816	91.2	93.8
MH500102	Taiwan/LSS18	816	91.4	93.8
MH500103	Taiwan/LSS30	816	91.4	93.8
MH500104	Taiwan/WFS1	816	91.3	93.4
MH500105	Taiwan/WFS2	816	91.4	93.8
MH500106	Taiwan/WFS4	816	91.4	93.8
MN384677	Thailand/TL1	816	87.9	91.9
MN384678	Thailand/TL2	816	87.6	91.5
MN384679	Thailand/TL3	816	91.2	94.5
MN384680	Thailand/TL4	816	87.7	91.4
MN384681	Thailand/TL5	816	89.8	92.6
MN384682	Thailand/TL6	816	91.7	94.5
MN384683	Thailand/TL7	816	91.5	93.8
MN384684	Thailand/TL8	816	89.7	90.1
MN389475	Thailand/TL9	816	93.6	94.9
MN389476	Thailand/TL10	816	87.9	91.5
MN389477	Thailand/TL11	816	88.1	91.9
MN389478	Thailand/TL12	816	87.5	91.5
MN389479	Thailand/TL13	816	91.7	91.2
MN389480	Thailand/TL14	816	90.6	91.5
MN389481	Thailand/TL15	816	91.8	94.5
MN395825	Thailand/TL16	816	87.0	90.1
MN395824	Thailand/TL17	816	87.3	90.4

[z] The sequence of TeMV isolate Pangda 15 (AM409188, Chiemsombat *et al*. 2014) was used for leader comparison. TeMV isolate Hanoi (NC_009742) was isolated from *Telosma cordata* (Ha *et al*. 2008); and TeMV isolate YN1 (MH137276) was isolated from *Senna alata* L. (Yao *et al*. 2019; direct submission).

[y] Percent identities (%) of the respective nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequences were analyzed by the Vector NTI Suite (InforMax Inc., Bethesda, MD, USA).

與美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 已登錄的 TeMV 病毒之 CP 核苷酸和胺基酸序列進行比對分析。

TeMV-DC6 分離株全長度基因體核酸之選殖及序列分析

將本研究之 TeMV-DC6 分離株，以其經由 3 次奎藜單斑分離，並回接於百香果之罹病葉片所抽取之全量核酸為模板。先以 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ 引子對所增幅出之病毒 3' 端約 1.3 kbp 核酸片段已知序列為基礎，與 GenBank 資料庫上已登錄之全長度 TeMV 核苷酸序列比對，設計可包含對應大蛋白 (polyprotein) 核苷酸之上游引子對，而下游引子對則依據已選殖定序之 TeMV-DC6 序列做設計。以 RT-PCR 法配合不同引子對組合 (圖 2B)，由 TeMV-DC6 核苷酸序列 3' 端往 5' 端之方向陸續進行本分離株全長度核酸序列之增幅、選殖與定序 (圖 2A)。設計使用的引子對組合包括 5'Te11u/Te1045d、Te976u/Te3155d、Te2697u/Te3770d、Te3626u/Te5001d、Te4911u/Te6699d、Te6642u/Te8397d、HRP-5/Oligo-d $(T)_{14}$，引子之序列詳如圖 2B。單步驟 RT-PCR 增幅之黏合溫度與反應時間，除 Te2697u/Te3770d 於 42℃/50s 條件進行外，其他各引子對之黏合溫度條件為 52℃/50s。

針對全長度基因體之選殖，將上述各不同引子組增幅所得之核酸片段，構築於 pGEM-T Easy Vector Systems，經篩選出含有特定片段之嵌入序列選殖株各 3 個，進行核苷酸定序分析。病毒基因體之 5' 端核苷酸序列，將不採計簡併式引子 (5'Te11u) 序列所黏合處之 18 個核苷酸。

TeMV 分離株之類緣關係分析

本研究以 RT-PCR 法，分別由台灣和泰國採集之百香果 TeMV 罹病組織，先以 Potyvirus 屬病毒的簡併式引子對 HRP 5/Oligo-$dT_{(14)}$ 進行其 3' 端約 1.3 kbp 之核酸片段增幅與選殖後進行核苷酸定序。選用對應 CP 區域之核苷酸和胺基酸序列，以 Vector NTI Suite 分析軟體進行序列相同度 (% identity) 分析；另進行類緣關係分析 (phylogenetic analysis)，依據 Tomimura *et al*. (2003) 所發表的方法進行。所有序列先以 CLUSTAL X version 1.8 (Thompson *et al*. 1997) 彙整分析後，再利用 PAUP 4.0 程式，以 neighbor-joining (NJ) 方法建構親緣關係樹，並結合 BRM 法 (bootstrap resampling method) (Felsenstein 1985; Thompson *et al*. 1997) 評估關係樹分群的統計顯著性。

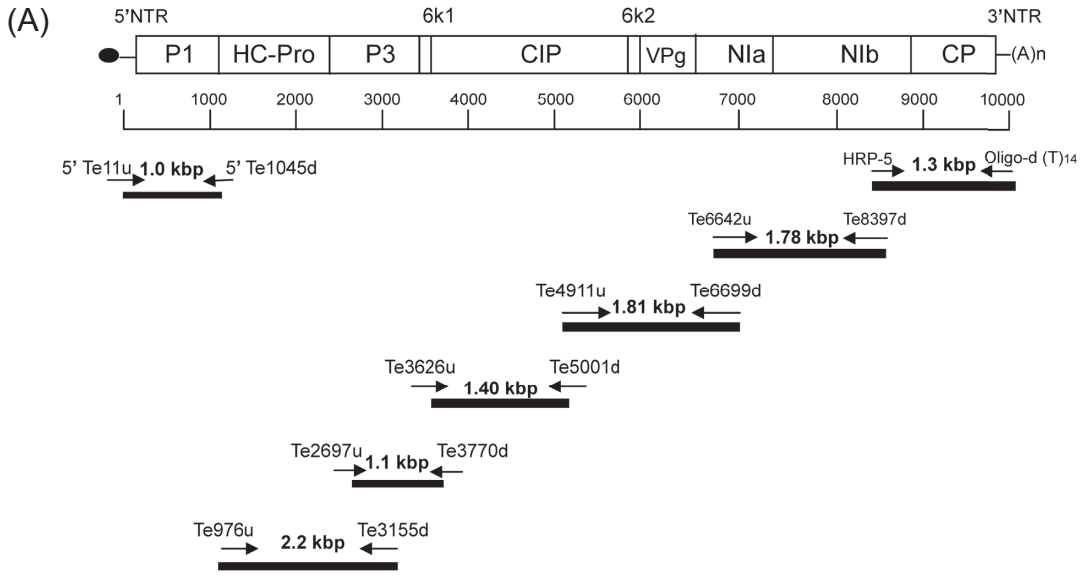
台灣和泰國來源之 TeMV 分離株個別引子對之設計與測試

依據表 3 所列由本研究所分離之 9 個台灣 TeMV 分離株，和 17 個泰國分離株所解得之 3' 端 1.3 kbp 核苷酸序列設計不同之引子對，分別有「台灣分離株」引子對 TwTe650u/TwTe650d、「泰國分離株」引子對 ThaTe430u/ThaTe430d、以及可同時檢測兩地之「台灣泰國分離株」引子對 TwTha840u/TwTha840d。相關引子序列及反應條件詳見表 1。取台灣和泰國採樣之百香果罹病組織，純化其全量核酸做為模板進行單步驟 RT-PCR 反應。反應成分參照市售檢測試劑套組進行 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)，於反應條件為 50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 2 min；之後進行 26 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min、52℃下煉合 50 s，72℃下聚合 1 min 30 s，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠進行分析判讀結果。

各組引子對可增幅出之核酸片段產物預估分別是 TwTe650u/TwTe650d 為 650 bp、ThaTe430u/ThaTe430d 為 430 bp、TwTha840u/TwTha840d 為 840 bp，依據預估之產物評估各組引子對之檢測效果。

台灣和泰國 TeMV 分離株引子對檢測台灣田間百香果罹病樣品之效果

由上述已建立之 3 組 TeMV 引子對 (TwTe650u/TwTe650d、ThaTe430u/ThaTe430d 和 TwTha840u/TwTha840d) 於台灣和泰國 TeMV 分離株之檢測差異性，收集台灣田間罹染 TeMV 之百香果大量樣品，並與泰國 17 個 TeMV 分離



(B) **5'Te11u: 5'-CAACTCGGCAAGACATAA3'**
5'Te1045d: 5'-GACGGCTTTCTTAGGAGT3'
Te976u: 5'-GATGTGCTGGGTTCAAC3'
Te3155d: 5'-GCTGTTTGAGGCTTCTG3'
Te2697u: 5'-AAAGATCAGAATGTGGCTA3'
Te3770d: 5'-CTGTTGGTTCCTTACTTGTG3'
Te3626u: 5'-TGAAAGAAGTGATGCYCTCT3'
Te5001d: 5'-TGCATRCTCCCATCATATTT3'
Te4911u: 5'-ACAACAAATMTKYTKTCCA3'
Te6699d: 5'-TCTGAAACTGTTGCYCTA AG3'
Te6642u:5'-AGTCCA AAGAAAGAAGAGAG3'
Te8397d: 5'-TCTGTAARCAATTCWGTRTG3'
HRP-5: 5'-GCGGGATCCGTNTGYGTNGAYGAYTTTYAAYAA3'
Oligo-d(T)$_{14}$: 5'-GCGGCCGC(T)$_{14}$

圖 2. *Telosma mosaic virus* DC-6 分離株全長度基因體之增幅與構築策略。

Fig. 2. The strategy for determining the complete RNA genomic sequence of *Telosma mosaic virus* DC-6 (TeMV-DC6). (A) Schematic representation of the genetic structure of TeMV-DC6 and the overlapped cDNA fragments amplified from reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) by the designed primers. Black bars represent length of amplified DNA fragments. (B) Sequences of the primers used in RT-PCR.

株，以上述 3 組引子對分別進行檢測，評估其對於台灣和泰國不同來源 TeMV 分離株之檢出率差異，以及其檢測鑑別效果，以開發可簡易判斷病毒株來源地或可同時檢出不同地方來源 TeMV 之廣效性引子對。

結果

TeMV-CP 多元抗體檢測評估

台灣 TeMV 分離株與不同 potyviruses 檢測效果

本研究針對 TeMV-CP 全長度核酸片段所構築之 pET-TeMVCP 選植株，於 *E. coli* Rosetta (DE3) 宿主內經由 IPTG 誘導大量表現蛋白，於 SDS-PAGE 電泳分析中可見 TeMV-CP 融合性蛋白之分子量大約為 30.1 kDa，與預估值相符 (圖 3A)。於西方墨點法中，市售 *Potyvirus* 屬病毒的單株抗體可與 TeMV-CP 融合性蛋白產生正反應 (圖 3C)，顯示 TeMV-CP 融合性蛋白具有 *Potyvirus* 病毒之抗原特性；以 TeMV-CP 融合性蛋白為抗原所製備之多元抗體，可與其同源的 TeMV-CP 融合性蛋白產生正反應 (圖 3B)；也可於 indirect ELISA 法中與下列樣品產生正反應 (表 2)，包括 (1) 同源之 TeMV-CP 融合性蛋白；(2) TeMV-DC6 等 9 個台灣百香果 TeMV 罹病組織；(3) 記錄上可感染百香果之其他種 potyviruses 包括 EAPV、CABMV、BYMV 及 SMV；(4) 以及其他受測試之不同 potyviruses 等。

泰國百香果病毒分離株之檢測效果

由泰國採樣之百香果葉片嵌紋或果實木質化徵狀之罹病組織樣品共 17 個，均與上述自製之 TeMV-DC6 多元抗體於 indirect ELISA 法中產生正反應讀值，A_{405nm} 之讀值在 0.33–1.99 之間，且均可與 *Potyvirus* 簡併式引子對 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ 產生預估值 1.3 kbp 之核酸片段產物 (結果未出示)，此產物經由核苷酸定序鑑定結果均為 TeMV 之成員 (表 3)。

上述免疫檢測結果，顯示本研究所製備之 TeMV-CP 多元抗體可應用於田間百香果 TeMV 罹病組織之檢測。但由於其可檢出其他種 potyviruses，顯示此多元抗體於 indirect ELISA 法中尚無法專一性地檢測 TeMV。

TeMV-DC6 分離株之全長度基因體核酸序列分析

以 DC6 分離株之百香果罹病葉片純化之

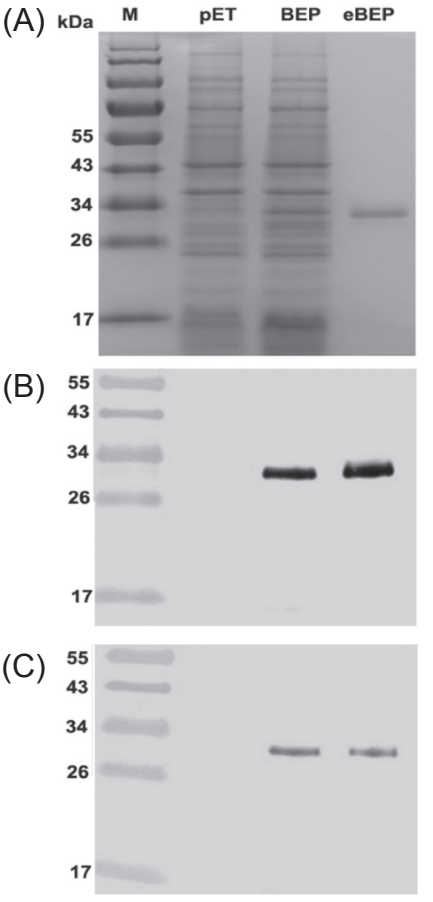


圖 3. 應用細菌大量表現的 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 融合性表現蛋白之 SDS-PAGE 電泳及西方墨點法分析。(A) TeMV 融合性表現蛋白 (30.1 kDa) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與 (B) 自製之 TeMV-CP 多元抗體、(C) Agdia 公司出品之 *Potyvirus* 單株抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28a (+) 蛋白 (未帶有病毒鞘蛋白)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白。

Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of *Telosma mosaic virus* (TeMV). (A) A 30.1 kDa bacterial-expressed fusion protein of TeMV-CP (lane eBEP) was observed in the SDS-PAGE assay. (B) The polyclonal antibody of TeMV-CP prepared in this study, and (C) the purchased monoclonal antibody of *Potyvirus* from Agdia were used to react with the bacterial-expressed TeMV-CP. Lane M, protein markers; lane pET, IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28a(+) without TeMV-CP insert; lane BEP, IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with TeMV-CP insert; and lane eBEP, the purified bacterial-expressed TeMV-CP.

全量核酸為模板，先以 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ 引子對進行 RT-PCR，於電泳分析中獲得與預估值相符合約 1.3 kbp 核酸片段，經選殖與定序後確定有一個轉譯架構 (open reading frame)，且與首次報導百香果上之 TeMV (AM409188) (Chiemsombat *et al*. 2014) 其核苷酸與胺基酸之相同度分別為 91.4% 和 93.8%。依據國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 所公布的 *Potyvirus* 屬病毒分類標準 (https://talk.ictvonline.org/)，應屬相同病毒種之不同株系 (Van Regenmortel *et al*. 2000; Adams *et al*. 2005)。進一步就 DC6 分離株全長度核酸序列定序，在不採計 5’ 端由簡併式引子 5’Te11u 序列之黏合處 18 個核苷酸後，共解得 10,022 個核苷酸，已登錄於 GenBank 取得登錄序號為 MN316594。

分析所解得的 10,022 個核苷酸序列之 TeMV-DC6 分離株基因體結構，其包含有部分的 5’ 端非轉譯區 (5’-untranslatable region, 5’-UTR) 249 個核苷酸和 3’-NTR 的 254 個核苷酸；含有一個大蛋白轉譯架構，蛋白轉譯起始位置為核苷酸 AUG，由 9,519 個核苷酸對應產生一條含 3,173 個胺基酸的大蛋白；對應不同功能蛋白之核酸序列長度 (核苷酸/胺基酸) 分別為：P1 蛋白 (1224/408)、HC-Pro 蛋白 (1371/457)、P3 蛋白 (1041/347)、6k1 蛋白 (156/52)、CI 蛋白 (1902/634)、6k2 蛋白 (159/53)、NIa-VPg 蛋白 (570/190)、NIa-Pro 蛋白 (729/243)、NIb 蛋白 (1551/517)、CP 蛋白 (816/272)。因此，對應 CP 有 816 個核苷酸，可轉譯出 272 個胺基酸，預估 CP 分子量約為 29.9 kDa，CP 起始位置後第 8–10 個胺基酸為 DAG，為 *Potyvirus* 屬病毒可被蚜蟲傳播之分子證據 (Atreya *et al*. 1991)。

比較 TeMV-DC6 分離株之大蛋白胺基酸序列與 GenBank 上已登錄具有全長度大蛋白胺基酸之 TeMV 病毒株，包括中國大陸學者發表之百香果 TeMV-PasFru 分離株 (MG944249) (Yang *et al*. 2018) 和越南學者發表可感染夜香花 (*Telosma cordato*) 之 TeMV-Hanoi 分離株 (NC_009742) (Ha *et al*. 2008)，TeMV-DC6 大蛋白胺基酸與此 2 個 TeMV 分離株之相同度分別為 97.2% 和 80.2%，顯示其與百香果來源的分離株有較高的相同度。

依據 *Potyvirus* 屬病毒胺基酸序列特性歸納 (Ward *et al*. 1992; Adams *et al*. 2005)，本研究所解得之 TeMV-DC6 分離株基因體對應的蛋白分解酶辨識位址 (protease recognition site)，分別是：P1 protease 為 VHHY/S、HC-Pro protease 為 YRVG/G。NIa protease 於 P3/6k1、6k1/CIP 及 CIP/6k2 之辨識位址分別為 VKTQ/G、VRLQ/S 及 VRLQ/S；於 6k2/VPg、VPg/NIa、NIa/NIb 及 NIb/CP 之辨識位址分別為 VSTQ/G、VKVE/S、VKTQ/S 及 VSLQ/S。TeMV-DC6 之大蛋白在各個不同功能蛋白之切位辨識位址，與中國大陸發表感染百香果之 TeMV-PasFru 分離株 (MG944249) (Yang *et al*. 2018) 完全相同，而與越南發表感染夜香花之 TeMV-Hanoi 分離株 (NC_009742) (Ha *et al*. 2008) 於 P3/6k1 (VTTQ/G)、6k1/CIP (VRAQ/S) 和 VPg/NIa (VTTE/S) 有差異。

台灣和泰國 TeMV 分離株之 CP 核酸序列分析

比對分析的 9 個台灣 TeMV 分離株，分別採集自南投埔里的大坪頂 (DC3、DC4、DC6 和 DC33)、台中市后里區 (LSS18 和 LSS30) 與霧峰區 (WFS1、WFS2、WFS4)。表 3 所列之台灣 TeMV 分離株之 CP 核苷酸和胺基酸序列，與 2014 年泰國學者首次發表之百香果 TeMV-Pangda15 分離株序列 (GenBank acc. no. AM409188) (Chiemsombat *et al*. 2014) 相同度分別在 90.9–91.4% 和 93.0–93.8% 之間，屬相同的病毒種。由核酸檢測與定序分析等分子鑑定結果，顯示台灣上述地區之百香果已有 TeMV 感染。由泰國當地採集之 17 個百香果 TeMV 分離株，與泰國 TeMV-Pangda15 分離株之 CP 核苷酸和胺基酸序列亦有高相同度，分別為 87.0–93.6% 和 90.1–94.9% 之間 (表 3)。台灣和泰國所選殖之 TeMV 分離株核酸序列，均已登錄於 GenBank 取得序號 (表 3)。

專一性及廣效性引子對檢測台灣和泰國分離株之差異

依據台灣和泰國之 TeMV 分離株基因體 3’ 端的核苷酸序列所設計的 3 組引子對，先行檢

測於 2017–2018 年由台灣所收集之 9 個已登錄於 GeBank 的分離株，以及由泰國收集之 17 個分離株 (表 3)，檢測結果顯示：(1) 以台灣分離株序列所設計的台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d)，可檢出所有受測的 9 個台灣 TeMV 罹病組織樣品，獲得預估值為 650 bp 的核酸片段產物 (圖 4)，但僅檢出 9 個泰國分離株 (圖 5、表 4)；(2) 以泰國分離株序列所設計的泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d)，完全無法檢出 9 個台灣分離株 (圖 4)，且僅可檢出 12 個泰國分離株 (圖 5、表 4)，但無法檢出的 5 個泰國分離株 (TL5、TL6、TL7、TL14 和 TL15)，可被台灣引子對檢出 (圖 5)；(3) 由台灣和泰國分離株序列比對後所設計的台灣泰國引子對 (TwTha840u/TwTha840d)，可檢出所有受測試的台灣和泰國分離株，且獲得預估值為 840 bp 的核酸片段產物 (圖 4、圖 5、表 4)；大部分樣品也會同時增幅出大小約 250 bp 的核酸片段產物 (圖 4、圖 5)，此片段經由定序結果確認乃對應 TeMV 之 Nuclear inclusion protein b (NIb)-C 端到 CP-N 端核甘酸的序列。

本試驗中顯示，單獨以台灣引子對或泰國引子對並無法完全檢出受測試之 17 個泰國百香果 TeMV 樣品 (圖 5)，且泰國引子對也無法

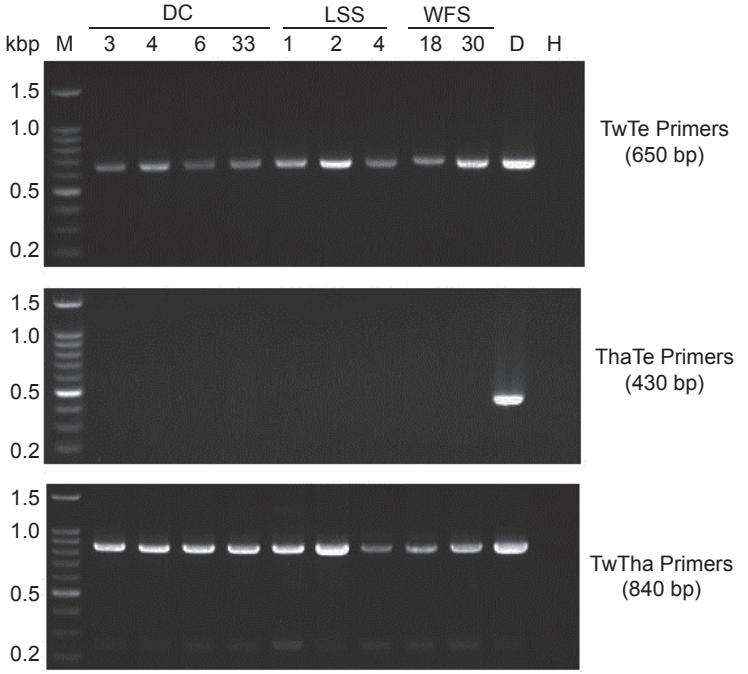


圖 4. 應用 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 專一性和廣效性引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 檢測台灣來源的百香果 TeMV 分離株之檢測效果。以專一性引子對 (TwTe: TwTe650u/TwTe650d 和 ThaTe: ThaTe430u/ThaTe430d) 和廣效性引子對 (TwTha: TwTha840u/TwTha840d) 增幅出之 TeMV 核酸片段產物大小，預估分別為 650 bp、430 bp 和 840 bp。行 M：100 bp DNA 標準標幟。行 DC、LSS 和 WFS：台灣不同地點之百香果罹病組織 (DC 埔里大坪頂、LSS 后里區、WFS 霧峰區)；行 D：百香果 TeMV 罹病組織正對照；行 H：健康百香果組織。

Fig. 4. Efficacy of the designed *Telosma mosaic virus* (TeMV)-specific primer sets (TwTe: TwTe650u/TwTe650d and ThaTe: ThaTe430u/ThaTe430d) as well as the TeMV-general primer set (TwTha: TwTha840u/TwTha840d) in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) detecting TeMV-infected passiflora samples collected from various locations in Taiwan. The expected size of amplified cDNA of each primer sets, i.e., TwTe, ThaTe and TwTha, are 650, 430 and 840 bp, respectively. Lane M: 100-bp ladder DNA molecular marker. Samples of lanes DC, LSS and WFS: TeMV isolates collected from various locations in Taiwan (DC, Nantou Puli; LSS, Houli Dist.; WFS, Wufeng Dist.); Lane D: TeMV-infected passiflora control; and Lane H: healthy passiflora.

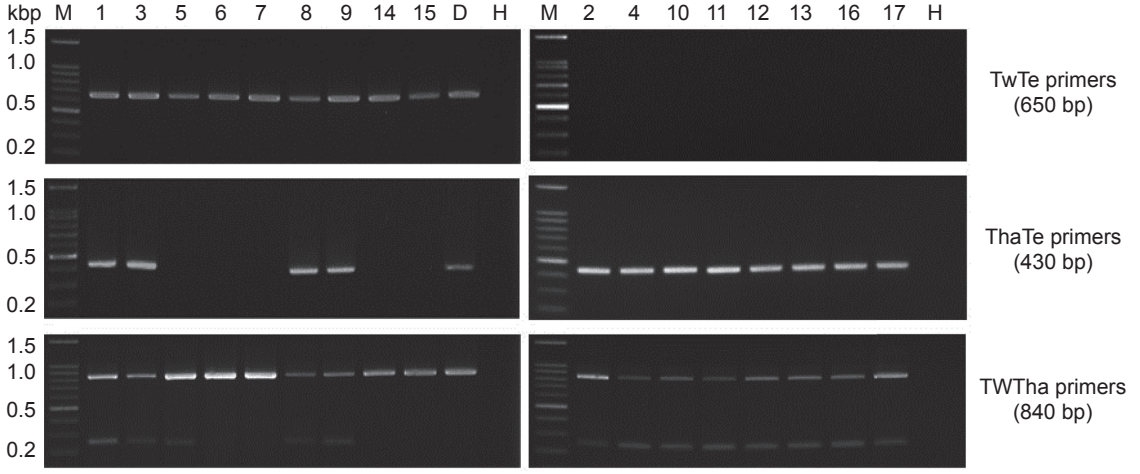


圖 5. 應用 *Telosma mosaic virus* (TeMV) 專一性和廣效性引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 檢測泰國來源的百香果 TeMV 分離株之檢測效果。以專一性引子對 (TwTe: TwTe650u/TwTe650d 和 ThaTe: ThaTe430u/ThaTe430d) 和廣效性引子對 (TwTha: TwTha840u/TwTha840d) 增幅出之 TeMV 核酸片段產物大小，預估分別為 650 bp、430 bp 和 840 bp。行 M：100 bp DNA 標準標幟。行 1–17：泰國不同地點 (曼谷、清邁、清萊) 之百香果罹病組織；行 D：TeMV 罹病組織正對照；行 H：健康百香果組織。

Fig. 5. Efficacy of the designed *Telosma mosaic virus* (TeMV)-specific primer sets (TwTe: TwTe650u/TwTe650d and ThaTe: ThaTe430u/ThaTe430d) as well as the TeMV-general primer set (TwTha: TwTha840u/TwTha840d) in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) detecting TeMV-infected passiflora samples collected from various locations in Thailand. The expected size of amplified cDNA of each primer sets, i.e., TwTe, Thate and TwTha, are 650, 430 and 840 bp, respectively. Lane M: 100-bp ladder DNA molecular marker. Samples of lanes 1–17: TeMV isolates from Bangkok, Chiang Mai and Chiang Rai in Thailand; Lane D: TeMV-infected passiflora control; and Lane H: healthy passiflora.

完全檢出受測試之 9 個台灣 TeMV 樣品 (圖 4)，而 TwTha840u/TwTha840d 引子對具有廣效檢出台灣和泰國兩地 TeMV 分離株之效果。

台灣和泰國 TeMV 分離株之類緣關係分析

由台灣和泰國所獲得之百香果不同 TeMV 分離株，以其全長度 CP 之胺基酸序列進行比對及分析類緣關係。由胺基酸類緣分析結果顯示 (圖 6)：(1) 本研究由台灣分離之 TeMV-DC6 等 9 個分離株，於 RT-PCR 檢測中均不與泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 反應產生 430 kbp 產物外，且在類緣上自成一分類群而與所有受測之泰國分離株有所區隔；(2) 本研究採集之 17 個泰國分離株中若可與泰國引子對反應，但無法與台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d) 反應者 (TL2、TL4、TL10、TL11、TL12、TL16 及 TL17) (圖 5)，則有自成一相近的分類群之趨勢 (圖 6)，此一分群中僅有 TL1 可與台灣引子對產生 650 kbp 片段 (圖 5)；(3) 泰國引子對無法檢出，但台灣引子對可檢出之泰國 TeMV 分離株 (TL5、TL6、TL7、TL14 和 L15) (圖 5)，則類緣上與台灣群較為接近 (圖 6) 但仍有區隔性。

以上結果，顯示台灣和泰國不同地理位置所分離到的百香果 TeMV 分離株在演化上具有類緣差異性；而 2014 年泰國學者首次發表之百香果 TeMV-Pangda 15 分離株序列 (AM409188) (Chiemsombat *et al*. 2014) 則與本試驗所採用之台灣和泰國 TeMV 分離株之類緣關係較遠 (圖 6)。

台灣和泰國 TeMV 分離株之 3 組引子對檢測田間百香果大量罹病樣品之鑑定效果

2017–2019 年期間，陸續於台灣的南投縣埔里大坪頂地區、台中市后里區和霧峰區田間所栽植之百香果進行 TeMV 發生調查，獲得可與 TeMV-CP 多元抗體產生正反應者。進一步利用 TeMV 台灣引子對 (TwTe650u/

表 4. 應用專一性和廣效性引子於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應檢測台灣和泰國田間百香果罹染 *Telosma mosaic virus* 效果之比較。

Table 4. Efficacy comparison of the designed *Telosma mosaic virus* (TeMV)-specific and TeMV-general primer sets in reverse transcription-polymerase chain reaction detecting TeMV-infected passiflora samples collected from Taiwan and Thailand.

Field	Sample no.	No. of samples positively detected in RT-PCR by[z]		
		TwTe primers (650 bp)	ThaTe primers (430 bp)	TwTha primers (840 bp)
Taiwan				
1	12	12	0	12
2	3	3	0	3
3	7	7	0	7
4	4	4	0	4
5	4	4	0	4
6	1	1	0	1
7	3	3	0	3
8	10	10	0	10
9	5	5	0	5
10	4	4	0	4
11	5	5	0	5
Total	**58**	**58**	**0**	**58**
Thailand				
Bangkok	12	9	7	12
Chiang Mai	3	0	3	3
Chiang Rai	2	0	2	2
Total	**17**	**9**	**12**	**17**

[z] Taiwan primers (TwTe, TwTe650u/TwTe650d) and Thailand primers (ThaTe, ThaTe430u/ThaTe430d) are specific primer sets while the Taiwan-Thailand primers (TwTha, TwTha840u/TwTha840d) are general primer set for detecting TeMV-infected *Passiflora* samples. The size of predicted cDNA fragments are 650, 430, and 840 base pairs for the primers Taiwan, Thailand, and Taiwan-Thailand, respectively.

TwTe650d) 以 RT-PCR 法鑑定確認，於 2017 年 11 月至 2018 年期間，由上述各地調查 22 個田區共 218 個百香果罹染病毒而葉片嵌紋病徵樣品，其中 70 個樣品有檢出 TeMV，獲得 TeMV 檢出率約 32.1% (結果未出示)；2019 年 6–8 月期間調查 18 個田區共 162 個百香果樣品，其中 11 個田區合計 58 個樣品有檢出 TeMV，獲得 TeMV 檢出率約 35.8% (結果未出示)。

進一步將 2019 年由台灣田間檢出 TeMV 罹病樣品共 58 個，以 3 組引子對進行 RT-PCR 鑑定檢測。以泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 均無法檢出此等台灣的 TeMV 罹病樣品；而台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d)、台灣泰國的廣效性引子對 (TwTha840u/TwTha840d) 均可檢出此受測的 58 個樣品 (表 4)。以上顯示，台灣泰國引子對 TwTha840u/TwTha840d 具有廣效性檢出台灣和泰國兩地 TeMV 分離株之效果。此外，泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 目前均法檢出由台灣分離到的 TeMV 分離株。因此，搭配 3 組引子對的檢測方式，可應用於台灣分離株之鑑別性檢測之判斷。

討論

本研究為台灣首度完成可實用於免疫檢測之百香果 TeMV-CP 多元抗體製備，台灣分離株 TeMV-DC6 之全長度基因體解序與鑑定，並釐清台灣與泰國 TeMV 分離株之類緣關係與 RT-PCR 分子檢測之差異性。同時設計可

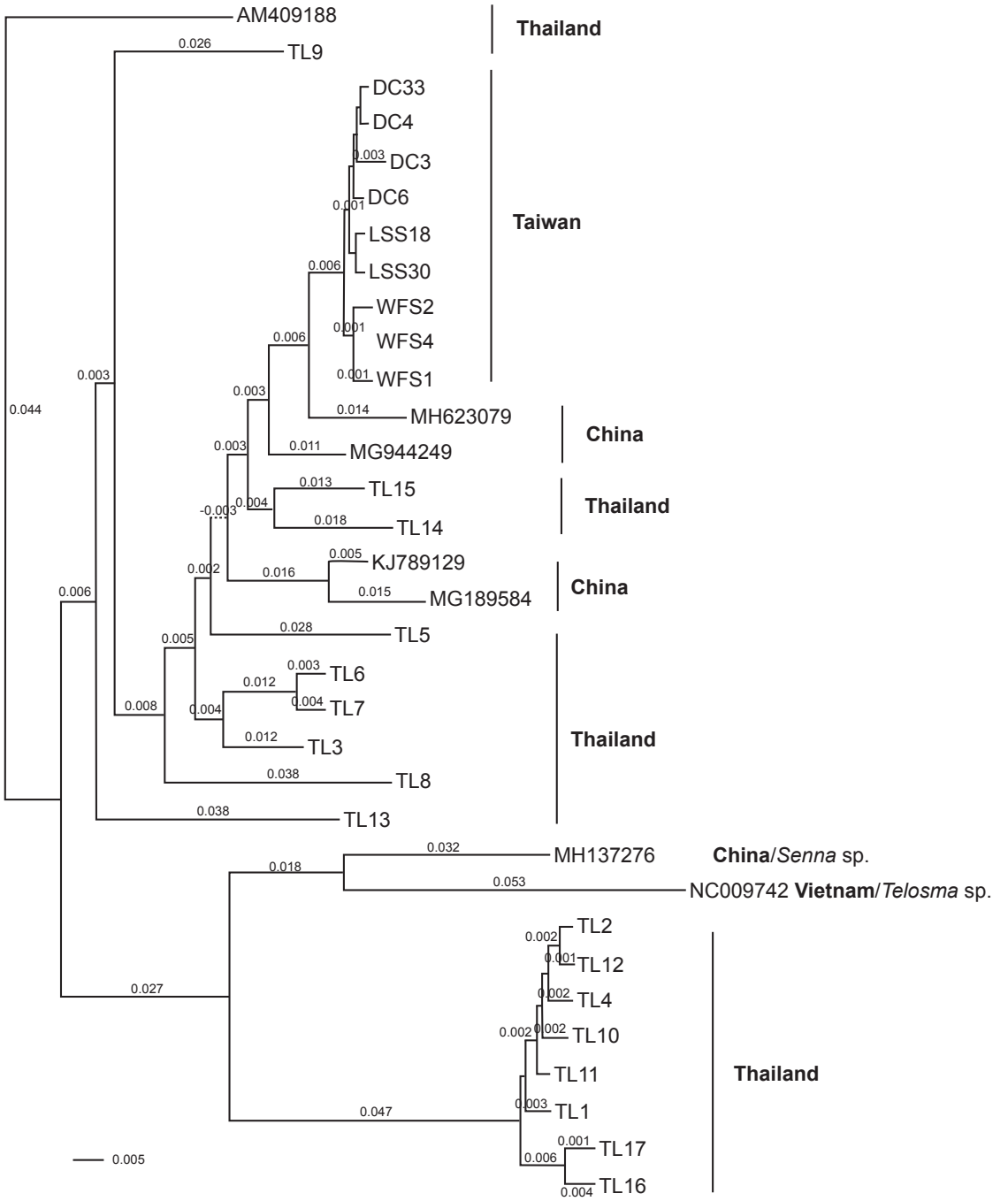


圖 6. 台灣和泰國之 *Telosma mosaic virus* 百香果分離株之類緣關係圖。

Fig. 6. A phylogram derived from the analysis of genetic distances based on the amino acid sequences of the coat proteins of different isolates of *Telosma mosaic virus* infecting *Passiflora* sp. from Taiwan, Thailand and those are available in GenBank. The tree was constructed using the neighbour-joining (NJ) algorithm with the bootstrap resampling method (1,000 random resamplings), using PAUP 4.0. Numbers at each node indicate the substitutions of bootstrap samples. Horizontal branch length is drawn according to the scale bar indicating 5 substitutions per 1,000 amino acid positions. Isolates available in GenBank from *Senna alata* L. and *Telosma cordata* were the accession no. of MH137276 and NC_009742, respectively.

於 RT-PCR 法中廣效性檢出台灣和泰國百香果 TeMV 分離株之引子對，對於掌握近年發生於泰國和台灣之百香果 TeMV 病毒，具有建立病毒鑑定技術之效益。

TeMV 於 2014 年被泰國學者發現可感染百香果而引起果實木質化 (Chiemsombat *et al*. 2014)，然而在 2016 年當時國內尚未發現此病毒前，以國外已發生之 TeMV-CP 基因序列合成方式，建立本病毒之核酸正對照品，並據以誘導表現 CP 作為抗原而成功製備出本病毒之多元抗體。此種在未能取得特定病毒罹病植物組織檢體下，透過基因合成技術進行病毒核苷酸序列之人工合成，以及利用表現載體之細菌生合成系統獲得病毒鞘蛋白抗原，突破無法取得病毒材料之瓶頸，而成功製備出可有效檢測特定病毒之多元抗體與正對照品，進而掌握對特定病毒之檢測鑑定能力，此策略以往也見諸對台灣尚未發生之蘭花病毒 *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) 之檢測試劑製備 (Chen & Chiang 2017)。再度印證此策略可應用於檢測國內尚未發生之重要作物病毒，藉此可事先建立實用之病毒檢測試劑，達到強化國內自主檢疫監測重要作物病毒能力的目標。

病毒多元抗體使用於免疫反應中容易產生非專一性的結果 (Shukla *et al*. 1988; Jordan & Hammond 1991)，乃因抗原免疫過程中，因為所對應同一分子的不同抗原決定基 (antigenic determinants) 而產生 (Souiri *et al*. 2014)；尤其以全長度 CP 為抗原所製備出的多元抗體，更容易導致對特定病毒的非專一性反應 (Shepard *et al*. 1974; Shukla *et al*. 1989)。本研究所製備之 TeMV-CP 多元抗體，於 indirect ELISA 法中，除對 TeMV 反應，同時可檢出同屬 *Potyvirus* 之百香果病毒包括 EAPV、CABMV、BYMV 和 SMV (表 2)。因此，就廣效性檢測而言，此 TeMV-CP 多元抗體可發揮對百香果上不同 potyviruses 之篩檢效益，惟須配合 RT-PCR 法輔助免疫檢測之鑑定，以能更精準地檢測與診斷百香果上的 TeMV。

TeMV 為引起百香果木質化病徵的病毒之一，影響百香果之果品品質 (Chiemsombat *et al*. 2014; Xie *et al*. 2017; Chen *et al*. 2018c)。本研究於泰國曼谷、清邁和清萊等地所採集之嵌紋葉片或木質化果實樣品，均只檢出 TeMV。顯見 TeMV 單獨感染可造成明顯的果實木質化徵狀 (圖 1C–1D、圖 1E–1F)，此與 2014 年泰國學者首次證實 TeMV 可引起百香果實之木質化之結果相符 (Chiemsombat *et al*. 2014)。由本研究結果推測，TeMV 為泰國當地引起果實木質化的主要病毒種類，不同於台灣引起百香果木質化之病毒主要為 EAPV (Chang 1992; Chong *et al*. 2018)。

作者於 2017 年底首度鑑定 TeMV 在台灣百香果上發生，同時期國內多篇報告確認此病毒之發生 (Tsai *et al*. 2018)。由 2017–2019 年期間於台灣田間百香果產地的調查結果顯示，TeMV 的檢出率大約在 32.1–35.8%，顯示本病毒已存在台灣田間，但仍為零星發生於不同田區狀態。基於 TeMV 已被證實發生於台灣田間百香果，因此台灣百香果健康種苗生產之農政輔導單位，於 2018 年起針對百香果種苗繁殖用母本株增加對 TeMV 之監測，以確保台灣產百香果種苗之健康品質。

本研究於台灣田間檢出 TeMV 之樣品，植株葉片均呈現嵌紋徵狀且大多與 EAPV 複合感染，其中僅單獨檢出 TeMV 的 2 個田間樣品，觀察亦可見其葉片嵌紋和果實呈現濃綠不均的木質化徵狀 (圖 1A)。由 TeMV-DC6 分離株於溫室接種百香果試驗結果，亦顯示其可引起明顯的葉片嵌紋徵狀 (圖 1B) (Chen *et al*. 2018a)，待後續接種病毒之植株開花結果後，能更明確地確認造成的果實病徵。

將田間百香果所收集之 9 個 TeMV 台灣分離株，與由泰國百香果所獲得之 17 個分離株進行類緣分析比對，顯示台灣和泰國的 TeMV 分屬於不同的類緣群。在核酸分子檢測上，可用不同引子對以 RT-PCR 檢測區分不同類緣群病毒 (圖 4)，以台灣引子對 (TwTe650u/TwTe650d) 可有效檢出台灣分離株，而泰國引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 則全部無法檢出 (圖 4、表 4)。若以泰國引子對搭配台灣泰國的廣效性引子對 (TwTha840u/TwTha840d)，則可就 RT-PCR 法區別台灣分離株。然實際的台灣 - 泰國分離株差異性，須以 TeMV-CP 的胺基酸序列做類緣關係分析才能確認分離株的地緣分類 (圖 6)，或採用核酸序列比對做分類

依據，可獲得較穩定而正確的鑑定結果 (Ward *et al*. 1992; Adams *et al*. 2005; Gibbs & Oshima 2010)。

台灣和泰國 TeMV 分離株具有演化上的類緣差異性 (圖 6)，且於 RT-PCR 檢測法中顯示以泰國 TeMV 引子對 (ThaTe430u/ThaTe430d) 並無法檢出所有測試的 9 個台灣分離株 (圖 4) 和台灣田間的 58 個 TeMV 罹病樣品 (表 4)，更加證實此二地理位置之百香果 TeMV 的分子差異性。近來中國大陸學者也發現 TeMV 分離株分類群依寄主不同而有分別，來自同一寄主之 TeMV 分離株則屬相同分類群 (Xie *et al*. 2017)。同一種病毒因地理分布位置或不同寄主來源而產生演化分類上的類緣分群現象，已見諸 TuMV (Ohshima *et al*. 2002; Tomimura *et al*. 2003; Gibbs & Ohshima 2010) 和 *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) (Chen *et al*. 2018b) 等 *Potyvirus* 病毒報告。

目前已有紀錄之 TeMV 全長度核苷酸序列，包括中國大陸之百香果 TeMV-PasFru 分離株 (Acc. no. MG944249) (Yang *et al*. 2018) 和越南之夜香花 TeMV-Hanoi 分離株 (Acc. no. NC_009742) (Ha *et al*. 2008)；本研究之 TeMV-DC6 分離株與同為百香果上之 TeMV-PasFru 分離株之大蛋白胺基酸序列相同度高達 97.2%，在各個不同功能蛋白之切位辨識位址完全相同，但與越南發表之夜香花 TeMV-Hanoi 分離株之相同度 80.2%，且蛋白酶辨識切位於 P3/6k1 (VTTQ/G)、6k1/CIP (VRAQ/S) 和 VPg/NIa (VTTE/S) 有差異，進一步說明百香果寄主來源之 TeMV 有較高的同源性的結論。

台灣生產之百香果種苗已有輸出東南亞國家 (主要為越南和泰國)，且於泰國已有發生 TeMV 之紀錄。本研究研發鑑別台灣分離株之分子鑑定法，以及由廣效性檢出台灣和泰國 TeMV 的檢測技術，將可應用於種苗輸出國外後，區分發生病毒病病原來源之爭議。台灣目前力行的百香果健康種苗生產體系及田間生產採用每年更新換植的一年生栽培技術，為台灣百香果產業能持續領先亞洲各國的關鍵技術。面對未來，持續保持健康種苗的內控品質要求，相信是台灣百香果產業在亞洲地區日益競爭的種苗市場中，持續居優勢地位的重要立基。本研究所開發之 TeMV 多元抗體及 3 組核酸檢測用引子對之應用，除了促使國內對百香果病毒診斷鑑定之檢測試劑更臻完備外，並能應用於提升台灣對 TeMV 的自主檢測與鑑定能力，尤其對於有類緣差異性的台灣和泰國 TeMV 分離株，本研究已開發的引子對可提升檢出不同來源 TeMV 的正確度與鑑定效益。

誌謝

本試驗承本組病毒研究室助理黃美容小姐協助多元抗體檢測試驗，行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 2017 年百香果重要病毒檢測試劑套組開發應用計畫 [106 農科-9.4.1-檢-B3(1)] 和行政院農業委員會 2018 年度農業研發成果跨域整合創新加值與產業化應用計畫 (MOST 107-3111-Y-067E-016) 之經費補助，謹此一併致謝。

引用文獻

Adams, M. J., J. F. Antoniw, and C. M. Fauquet. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. Arch. Virol. 150:459–479.

Atreya, P. L., C. D. Atreya, and T. P. Pirone. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in the loss of insect transmissibility of a plant virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:7887–7891.

Baker, C. A., A. Jeyaprakash, C. G. Webster, and S. Adkins. 2014. Viruses infecting *Passiflora* species in Florida. Plant Pathol. Circ. 415. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, FL. https://www.fdacs.gov/content/download/40511/file/ppcirc415.pdf (visit on 08/22/2019)

Chang, C. A. 1992. Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with passionfruit woodiness virus. Phytopathology 82:1358–1363.

Chang, C. A., E. Hiebert, and D. E. Purcifull. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyvirus. Phytopathology 78:1266–1275.

Chang, C. A., L. C. Huang, Y. C. Chen, Y. Y. Lin, H. C. Lu, and Y. D. Lin. 2017. A review of the research and control of passionfruit virus diseases in Taiwan. J. Plant Med. 59:1–12.

Chang, C. A. and H. H. Lin. 1989. Passionfruit crinkle virius, a new potyvirus isolated from passionfruit in Taiwan. Plant Prot. Bull. 31:409–410.

Chen, C. C., H. T. Hsu, Y. H. Cheng, C. H. Huang, J. Y. Liao, H. T. Tsai, and C. A. Chang. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. Bot. Stud. 47:369–378.

Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2017. Development and application of the molecular and serological detection methods for *Cymbidium ringspot virus*. J. Taiwan Agric. Res. 66:202–218. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C., F. L. Chiang, C. M. Hsu, and M. R. Huang. 2018a. Development and application of nucleic acid detection technology for *East Asian passiflora virus* and *Telosma mosaic virus*. p.52. *in*: Proceeding of Annual Meeting of the Plant Protection Society of Republic of China. November 30, 2018. Taichung, Taiwan. The Plant Protection Society of Republic of China, Taichung. (in Chinese)

Chen, C. C., F. L. Chiang, and C. H. Huang. 2018b. Molecular and serological identification of Gloriosa strip mosaic virus on Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook). J. Taiwan Agric. Res. 67:229–246.

Chen, S. S., N. Yu, S. H. Yang, B. P. Zhong, and H. H. Lan. 2018c. Identification of Telosma mosaic virus infection in *Passiflora edulis* and its impact on phytochemical contents. Virol. J. 15:168.

Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, C. H. Chiang, and C. A. Chang. 2014. First report of *Euphorbia leaf curl virus* and *Papaya leaf curl Guangdong virus* on passion fruit in Taiwan. Plant Dis. 98:1746.

Chiemsombat, P., S. Prammanee, and N. Pipattanawong. 2014. Occurrence of *Telosma mosaic virus* causing passion fruit severe mosaic disease in Thailand and immunostrip test for rapid virus detection. Crop Prot. 63:41–47.

Chong, Y. H., Y. H. Cheng, H. W. Cheng, Y. C. Huang, and S. D. Yeh. 2018. The virus causing passionfruit woodiness disease in Taiwan is reclassified as *East Asian passiflora virus*. J. Gen. Plant Pathol. 84:208–220.

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483.

Coutts, B. A., M. A. Kehoe, C. G. Webster, S. J. Wylie, and R. A. C. Jones. 2011. Indigenous and introduced potyviruses of legumes and *Passiflora* spp. from Australia: Biological properties and comparison of coat protein nucleotide sequences. Arch. Virol. 156:1757–1774.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791.

Fischer, I. H. and J. A. M. Rezende. 2008. Diseases of passion flower (*Passilora* spp.). Pest Tech. 2:1–19.

Fukumoto, T., M. Nakamura, M. Rikitake, and H. Iwai. 2012. Molecular characterization and specific detection of two genetically distinguishable strains of *East Asian Passiflora virus* (EAPV) and their distribution in southern Japan. Virus Genes 44:141–148.

Gibbs, A. and K. Ohshima. 2010. Potyviruses and the digital revolution. Annu. Rev. Phytopathol. 48:205–223.

Ha, C., S. Coombs, P. A. Revill, R. M. Harding, M. Vu, and J. L. Dale. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Arch. Virol. 153:25–36.

Iwai, H., R. Terahara, Y. Yamashita, S. Ueda, and M. Nakamura. 2006a. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-Shima strain of *East Asian Passiflora potyvirus*. Arch. Virol. 151:1457–1460.

Iwai, H., Y. Yamashita, N. Nishi, and M. Nakamura. 2006b. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species *East Asian Passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. Arch. Virol. 151:811–818.

Jordan, R. and J. Hammond. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 72:25–36.

Kil, E. J., H. Seo, H. S. Byun, S. S. Suh, T. K. Lee, K. Y. Lee, J. H. Lee, J. K. Kim, S. J. Ko, H. S. Choi, C. S. Kim, and S. Lee. 2016. First report of *Euphorbia leaf curl virus* in passion fruits in South Korea and its natural occurrence in papaya. Plant Dis. 100: 865.

Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of dasheen mosaic virus (Caladium isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. Arch. Virol. 143:2461–2469.

Liberato, J. R. and F. M. Zerbini. 2019. Diseases of passionfruit (*Passiflora* spp.). https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Passionfruit.aspx (visit on 02/26/2020)

Ma, X. Y., J. H. Cai, G. X. Li, B. X. Qin, and X. P. Zhou. 2004. Molecular characterization of a distinct *Begomovirus* infecting *Euphorbia pulcherrima* in China.

J. Phytopathology 152:215–218.

Nascimento, A. V. S., E. N. Santana, A. S. K. Braz, P. F. Alfenas, G. Pio-Ribeiro, G. P. Andrade, M. G. de Carvalho, and F. M. Zerbini. 2006. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. Arch. Virol. 151:1797–1809.

Noveriza, R., G. Suastika, S. H. Hidayat, and U. Kartosuwondo. 2012. *Potyvirus* associated with mosaic disease on patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] plants in Indonesia. J. ISSAAS 18:131–146.

Ohshima, K., Y. Yamaguchi, R. Hirota, T. Hamamoto, K. Tomimura, Z. Tan, T. Sano, F. Azuhata, J. A. Walsh, J. Fletcher, J. Chen, A. Gera, and A. Gibbs. 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. J. Gen. Virol. 83:1511–1521.

Pappu, S. S., H. R. Pappu, C. A. Chang, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. Plant Dis. 82:1121–1125.

Parrella, G. and C. Lanave. 2009. Identification of a new pathotype of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) infecting blue passion flower and some evolutionary characteristics of BYMV. Arch. Virol. 154:1689.

Shepard, J. F., G. A. Secor, and D. E. Purcifull. 1974. Immunochemical cross-reactivity between the dissociated capsid proteins of PVY group plant viruses. Virology 58:464–475.

Shukla, D. D., P. M. Strike, S. L. Tracy, K. H. Gough, and C. W. Ward. 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. J. Gen. Virol. 69:1497–1508.

Shukla, D. D., J. Jilka, M. Tosic, and R. E. Ford. 1989. A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity-purified polycional antibodies directed towards virus-specific N termini of coat proteins. J. Gen. Virol. 70:13–23.

Song, Y. S. and K. H. Ryu. 2011. The complete genome sequence and genome structure of passion fruit mosaic virus. Arch. Virol. 156:1093–1095.

Souiri, A., M. Zemzami, S. Amzazi, and M. M. Ennaji. 2014. Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. Eur. J. Sci. Res. 123:281–295.

Spiegel, S., M. Zeidan, I. Sobolev, Y. Beckelman, V. Holdengreber, Y. Tam, M. Bar Joseph, Z. Lipsker, and A. Gera. 2007. The complete nucleotide sequence of Passiflora latent virus and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. Arch. Virol. 152:181–189.

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

Tomimura, K., A. J. Gibbs, C. E. Jenner, J. A. Walsh, and K. Ohshima. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent “emergence” in east Asia. Mol. Ecol. 12:2099–2111.

Tsai, Y. T., Y. C. Chen, L. C. Huang, Y. K. Chen, and C. A. Chang. 2018. Isolation and Identification of *Telosma mosaic virus* on passionfruit in Taiwan. p.28. *in*: Proceeding of Annual Meeting of the Plant Protection Society of Republic of China. January 26, 2018. Taichung, Taiwan. The Plant Protection Society of Republic of China, Taichung. (in Chinese)

Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Farcquet, D. H. C. Bishop, E. B. Cartens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner. 2000. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press. San Diego, CA. 1162 pp.

Wang, X., Y. Xie, and X. Zhou. 2004. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. Virus Genes 29:303–309.

Ward, C. W., N. M. McKern, M. J. Frenkel, and D. D. Shukla. 1992. Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. Arch. Virol. 5:283–297.

Wylie, S. J. and M. G. K. Jones. 2011. The complete genome sequence of a *Passion fruit woodiness virus* isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. Arch. Virol. 156:479–482.

Xie, L. X., X. Y. Zhang, S. Zheng, L. J. Zhang, and T. Li. 2017. Molecular identification and specific detection of *Telosma mosaic virus* infecting passion fruit. Sci. Agric. Sin. 50:4725–4734.

Yang, K., H. Yan, L. Song, P. Jin, W. Miao, and H. Cui. 2018. Analysis of the complete genome sequence of a potyvirus from passion fruit suggests its taxonomic classification as a member of a new species. Arch. Virol. 163: 2583–2586.

Yao, L. Z., X. Q. Li, J. G. Wang, S. Y. Chen, and X. J. Wang. 2019. First report of *Telosma mosaic virus* infecting Emperor’s candlesticks (*Senna alata*) in China. Plant Dis. 103:594.

Molecular Characterization of the *Telosma mosaic virus* Passionfruit Isolates and the Development and Application of Its Wide-Spectrum Molecular Detection Techniques

Wen-Li Lee[1], Chinnapan Thanarut[2], Chih-Cheng Hsu[3], Guo-Chi Lee[4], Fen-Lang Chiang[5], and Chin-Chih Chen[6,*]

Abstract

W. L., Lee, Chinnapan Thanarut, C. C., Hsu, G. C., Lee, F. L., Chiang, and C. C., Chen. 2020. Molecular characterization of the *Telosma mosaic virus* passionfruit isolates and the development and application of its wide-spectrum molecular detection techniques. J. Taiwan Agric. Res. 69(1):46–64.

In this study, a polyclonal antibody against *Telosma mosaic virus* (Ab-TeMV) was prepared from the bacteria expressed TeMV coat protein gene. Ab-TeMV had a broad-spectrum detection efficiency for the potyviruses of TeMV, *East Asian passiflora virus* (EAPV), *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) and *Soybean mosaic virus* (SMV). The full-length genomic nucleotide sequences of TeMV-DC6, an isolate infecting passiflora in Taiwan, was determined (GenBank accession number MN316594). The incidence of TeMV on passiflora in fields of Taiwan during 2017–2019 was 32.1 to 35.8% by serological and molecular detection reagents of TeMV prepared in this study. Moreover, only TeMV was positively detected from those 17 virus-infected passiflora samples (showed symptoms of leaf mosaic and woodiness fruit) collected from Thailand. The CP amino acid sequences of those TeMV isolates collected from Taiwan and Thailand's passifloa fields shared higer than 90% identities with that of the known TeMV (AM409188) in GenBank. However, the phylogenetic analysis indicated that TeMV isolates of passiflora from different geographical locations are different in phylogenetic evolution, because 9 Taiwan isolates are closely related and separated from those 17 Thailand isolates. Three sets of primer pairs were designed based on the aligned nucleotide sequences of Taiwan and Thailand TeMVs, and used in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Among the 67 Taiwan isolates and 17 Thailand isolates, the Taiwan primer pair (TwTe650u/TwTe650d) can amplify the expected amplicons from all of the tested Taiwan isolates and 9 out of the 17 Thailand isolates. The Thailand primer pair (ThaTe430u/ThaTe430d) only detected 12 out of the 17 Thailand isolates and could not detect all of the Taiwan isolates. The Taiwan-Thailand primer pair (TwTha840u/TwTha840d) could detect all of the tested isolates. In this report, the incidences of TeMV in Taiwan and Thailand were clarified and the full-length genomic sequence of Taiwan isolate DC6 was first completed. The phylogenetic differences between Taiwan and Thailand TeMV isolates were demonstrated, and the primer pairs were developed for the wide-spectrum detection of those passiflora TeMV isolates in Taiwan and Thailand to improve the detection efficacy of TeMV.

Key words: *Passiflora* sp., *Telosma mosaic virus* (TeMV), Polyclonal antibody, Full-length sequence, Broad-spectrum detection by RT-PCR.

Received: September 7, 2019; Accepted: October 24, 2019.

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

[1] Research Fellow and Director, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

[2] Instructor, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai, Thailand.

[3] Assistant Research Fellow, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

[4] Chief, Technology Service Section, Department of Science and Technology, Council of Agriculture, Taipei, Taiwan, ROC.

[5] Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[6] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.