台灣中南部瓜類作物與粉蝨中雙生病毒之監測與其基因體變異性分析

廖吉彥[1]、鄧汀欽[1]、林鳳琪[2]、黃莉欣[3]、彭瑞菊[4]、陳宗祺[5]、賴儀瑾[6]、陳信宏[6]、宋明彥[6]、胡仲祺[6,7]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[2] 行政院農業委員會農業試驗所應用動物組

[3] 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

[4] 行政院農業委員會台南區農業改良場

[5] 亞洲大學生物科技學系

[6] 國立中興大學生物科技學研究所

[7] 聯絡作者，電子郵件信箱：cchu@dragon.nchu.edu.tw

摘　　要

洋香瓜等瓜類作物極具經濟價值，然近年來迭遭數種新興病毒病害之大規模感染，造成農民的重大損失。其中由菸草粉蝨(*Bemisia tabaci* species complex)所傳播的南瓜捲葉病毒 *Squash leaf curl virus* (SqLCV，雙生病毒科)於台灣中、南部地區洋香瓜上造成捲葉病的肆虐，在 2008 下半年造成洋香瓜捲葉病害的大流行，甚而導致全園廢耕的嚴重經濟損失，成為洋香瓜產業的主要限制因子之一。亟需開發方便有效的方法，以監測 SqLCV 於粉蝨與作物中的帶毒與感染狀況，預作適當之防治工作。本研究研發利用滾環式擴增法(Rolling Circle Amplification，RCA) 檢測雙生病毒環狀 DNA 的技術，持續於雲林、嘉義、與台南等縣市之主要瓜類作物栽培區進行 SqLCV 之監測。發現 SqLCV 普遍存在於田間瓜類作物與粉蝨族群中，但基因體變異性極大。且帶毒率與感染率隨作物種類而不同，其中以西瓜最低，洋香瓜最高。為進一步了解雙生病毒基因體在不同時空環境中的變異性，本研究分析比對自 2007 年至 2010 年不同時間點於台灣中南部分屬不同地理位

置的洋香瓜栽培區所採集的 SqLCV 基因體序列，並分別比對來自於洋香瓜葉片或粉蝨體內所選殖之 SqLCV 基因體序列，發現在不同時空環境下經常發生變異的核苷酸位置較常出現於基因間隙區域(intergenic region)與外鞘蛋白(coat protein)編碼區域中。而其他基因體區域相對較為穩定。不同的地理環境與瓜類作物對於雙生病毒的基因體序列亦有影響，此基因體序列之變異性亦可作為用於追蹤雙生病毒來源與設計有效病毒防治策略的參考工具。

關鍵詞： 瓜類作物、捲葉病害、雙生病毒、基因體、滾環式擴增法

緒　　言

洋香瓜與甜瓜等瓜類為具有極高經濟價值的作物，也是台灣中南部許多鄉鎮(如將軍鄉、七股鄉等)的特色產物。然而由於台灣地區洋香瓜等瓜類作物主要的栽培區位於台灣中、南部地區，在氣候條件上屬於較為高溫的區域，極為適合病毒的媒介昆蟲(例如粉蝨、薊馬、蚜蟲等)之生長與繁殖。因此，病毒病害已成為近年瓜類作物栽培生產的主要限制因子之一。早在1980年，Lovisolo氏已統計出在瓜類作物上有25種病毒的感染[18]；而在台灣地區，於2005年前已在瓜類作物上發現有七屬的病毒，分別為 *Luteovirus*、*Tobamovirus*、*Cucumovirus*、*Potyvirus*、*Tospovirus*、*Comovirus*、與*Begomovirus*[3]。自2006年以來，陸續有屬於*Tospovirus*、*Begomovirus*、與*Crinivirus*等屬的植物病毒輪流造成嚴重危害，部分瓜田可達全園廢耕的程度，導致鉅大的經濟損失[1,13]。

在近年流行於台灣中南部地區的瓜類病毒中，*Begomovirus*屬的雙生病毒(geminiviruses)是較為特殊的植物病毒。雙生病毒具有一條(稱為DNA A)或兩條(分別稱為DNA A與DNA B)的環狀單股DNA基因體，可在多種重要的農藝、園藝、蔬菜、與纖維作物上造成嚴重感染。在近年來RNA基因體的植物病毒已經陸續發現或育成抗病毒作物的情況之下，具有DNA基因體的雙生病毒已經成為世界上最具有經濟重要性的植物病原之一。

*Begomovirus*屬的雙生病毒在近幾年於台灣中、南部地區洋香瓜上造成捲葉病的肆虐，並在2008下半年造成洋香瓜捲葉病害的大流行，極具有經濟重要性。洋香瓜捲葉病的病原主要為雙生病毒科中的南瓜捲葉病毒(*Squash leaf curl virus*，簡稱SqLCV)。洋香瓜苗在定植初期遭SqLCV感染後，會出現嚴重的葉片捲曲病徵(如圖一所示)，通常為向下捲曲，心葉捲曲情形更為明顯，瓜藤節間縮短，生長停滯，開花、授粉、與結果均受到干擾，嚴重時甚而導致全園無收成的經濟損失。*Begomovirus*屬的雙生病毒由粉蝨(*Bemisia tabaci* species complex)所傳播(如圖二所示)。因粉蝨逐漸適應台灣的農作物生態，並且已對於幾種常用的殺蟲劑(如益達胺等新尼古丁類藥劑)產生抗藥性，在台灣地區的發作密度亦日漸升高，必須密切注意防範。

“預防”對於植物病毒病害之防治是最為經濟與有效的策略。利用抗病毒品種、使用健康種苗，並須密切監控媒介昆蟲的棲群密度及帶毒率，以防範田間的病害散佈，才能達到事半功倍的效果。而這類預防工作的成功關鍵，則在於種苗的病毒檢測、栽植初期的病害與粉蝨防治、及帶毒率監控措施。早期發現並確認感病的苗株，可以及早加以拔除，並補植健康苗株，可節省大量的農藥、肥料、與人工費用，並可以移除田間的初級接種源(Primary inoculum)，避免病害傳播。



圖一、定植初期之健康洋香瓜植株(左)，及遭受*Squash leaf curl virus* (SqLCV)感染的洋香瓜植株(右)。感病之洋香瓜植株心葉與營養葉出現明顯的向下捲曲(如箭號所示)。

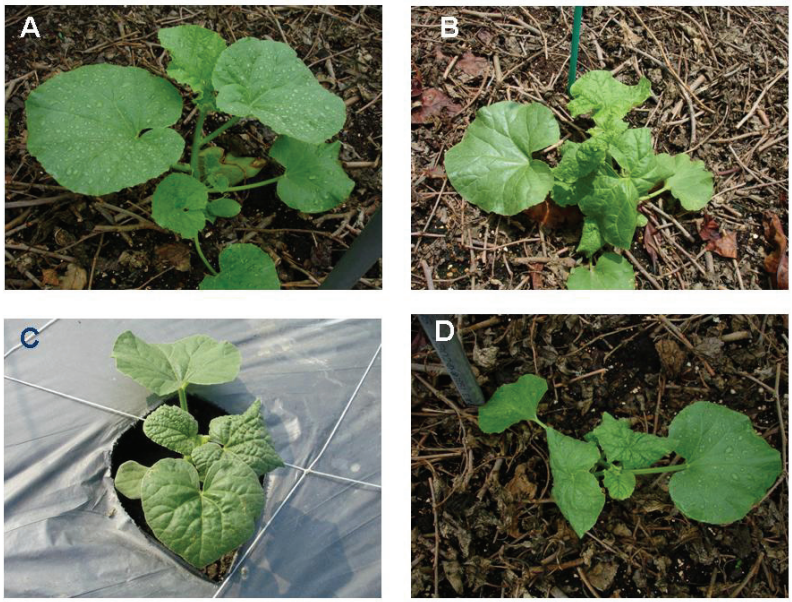
Fig. 1. Healthy (left) and *Squash leaf curl virus* (SqLCV)-infected muskmelon plants at early stage after setting. Notice that the young buds and leaves of the SqLCV-infected plant show severe downward curling symptoms (as indicated by the arrows).



圖二、粉蝨(*Bemisia tabaci*)為SqLCV之媒介昆蟲，性喜於洋香瓜葉片背面取食與繁殖。農民與監測工作人員必須經常檢視葉片背面，以期提早發現粉蝨的危害與及時進行防治工作。

Fig. 2. The whitefly (*Bemisia tabaci*) is the vector of SqLCV. Whiteflies are usually found feeding and mating on the back side of the leaves. Growers and monitoring workers are advised to frequently check the back side of leaves for the infestation of whiteflies and take prompt actions to prevent the spread of the disease.

然而，對於病毒病害而言，有許多生理因子或環境條件會造成類似病毒感染的病徵，例如洋香瓜苗株定植初期，可能因為土壤鹽分較高或農民使用生長激素等因素而造成類似SqLCV感染病徵的心葉捲曲、節間縮短等現象(如圖三所示)，但是以靈敏度極高的聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)卻無法檢測出病毒DNA，此類病徵通常在環境條件改善後，即可在數天內恢復正常生長。而有些植株，看似無病徵，但是卻屬於病毒潛伏性感染，會在開花後無法揹果或產生低品質的畸形果。因此，亟需研發高靈敏度、高專一性、且方便使用的病毒檢測方法，以利種苗病毒檢測、與媒介昆蟲帶毒率監測等相關工作之進行。



圖三、定植初期出現類似SqLCV感染病徵之洋香瓜植株。疑似感染的植株並未檢測出SqLCV之病毒DNA，且植株在約一週後恢復正常生長。
Fig. 3. Muskmelon plants showing leaf curling symptoms similar to those caused by SqLCV infections at early stage after setting. The symptom-less plantlet (A) was found to be infected by SqLCV and developed severe symptoms at later stages. However, the symptomatic muskmelon plantlets showing downward leaf curling symptoms (B, C, and D) were SqLCV-free, and recovered to normal phenotype after about one week.

此外，抗病育種與病毒檢測監控技術的研發皆需基於對病毒基因體變異性的了解。雙生病毒之基因體具有極高的變異性[7,9,12,19]。Duffy 與Holmes(2008)長期追蹤感染番茄的*Tomato yellow leaf curl virus*(TYLCV)的基因體變異性，推算出TYLCV基因體DNA的變異速率為每個核苷酸位置每年發生2.88 x 10^{-4}次的變異。這些快速變異的基因體序列，可改變病毒的致病性、與寄主範圍，突破目前所使用的抗病品種，並使雙生病毒得以逃避依賴專一性病毒檢測法之偵檢。而目前對於感染瓜類作物的雙生病毒之基因體變異性與其變異速度，則仍尚待吾人之深入探討。

因此，本研究的主要目標為改良與建立檢測葉片與粉蝨中SqLCV之標準操作流程，並進一步應用此技術監測台灣地區洋香瓜上SqLCV之感染狀

況及其媒介昆蟲中之帶毒率，以作為設計病毒病害防治策略之重要依據。期望能協助上級指導單位與相關工作人員確實掌握重要病毒病害的發生情況、流行病趨勢、以及病毒基因體與致病性的變異情形，並進而發展瓜類作物雙生病毒病害的有效防治策略。

材料與方法

瓜類作物葉片樣本與粉蝨樣本之採集

自台灣中南部洋香瓜與甜瓜主要產地 (台南市安南區、台南縣七股、佳里、將軍、仁德、彰化縣溪湖、雲林縣二崙、崙背等地區)選定小區域採樣區，參考林等(1997)之研究方法，自洋香瓜栽培田中採集瓜葉與粉蝨樣本，以徒手翻葉法使用吸蟲器採集粉蝨。

植物與單一粉蝨總量DNA萃取

將前項採集之葉片樣本撕取0.1g之葉片組織(含有主葉脈者為佳)或單一隻粉蝨樣本放置於Eppendorf小管，以Eppendorf研磨器磨碎，並加入100 μl之DNA萃取緩衝液(10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1%, Triton X-100) [(11)]於管中，置於60℃之乾浴加熱器處理5分鐘後，再加入等體積的Phenol (pH 8.0)進行DNA萃取。經離心分層後，吸取上清液，加入2.5倍體積的95%酒精，混合後進行低溫酒精沉澱。所得的DNA沉澱物經真空乾燥後，溶解於20 μl的去離子水中，作為後續檢測反應之模板。

滾環式擴增法(Rolling circle amplification, RCA)

由於雙生病毒本身即具有環狀單股DNA，極為適合作為RCA的模版，因此本研究參考Inoue-Nagata 等人(2004)及Haible等人(2006)的方法，以RCA方法進行SqLCV基因體DNA的檢測。本方法不需事先知道病毒的基因體序列資訊，僅需採用6-mer逢機引子對，即可利用Phi29 DNA polymerase的DNA鏈取代特性於恆溫條件(30℃)下進行環狀複製與擴增作用。特別適用

於基因體變異迅速的雙生病毒之偵測。增幅的產物並進一步利用限制酵素*Bam*HI、*Eco*RI、與*Pst*I進行截切，並配合洋菜膠體電泳[23]分析增幅之產物。

南方墨點雜合法(Southern blot hybridization)

由於RCA方法會增幅環狀的DNA分子，不僅限於雙生病毒DNA，因此為確認由RCA所增幅之產物的確來自於雙生病毒基因體模版，本研究進行南方墨點雜合法分析[23]。所使用的探針為利用聚合酶鏈反應以Digoxigenin(DIG)標定之SqLCV外鞘蛋白基因編碼區域。由於探針在高嚴苛度(High stringency)條件下，可辨認具有90%序列相似度的DNA分子，故仍可用於確認已產生變異的SqLCV基因體DNA。

病毒基因體DNA序列分析

自植物葉片或粉蝨中所擴增得到的雙生病毒DNA，以適當之限制酵素(如BamHI)切割後，選殖於載體pUC119之相對切位。每一樣本選取至少二個樣本進行DNA定序(源資生物科技公司、明欣生物科技公司)。所獲得之雙生病毒基因體序列利用GCG套裝軟體(version 11.1.3, Accelrys Inc.)中的之預設參數及條件，以Gap與BestFit程式進行兩兩序列比對，並以PileUp與PaupSearch進行多重序列比對與親緣演化分析。除了本研究所定序的台灣中南部地區洋香瓜與粉蝨體內之SqLCV分離株外，本研究並自GenBank[4]選取不同地理區域的SqLCV代表性株系，已進行親緣演化分析。所使用的株系與其GenBank擷取碼(Accession number)顯示於圖說明中。

結果與討論

以滾環式擴增法檢測雙生病毒DNA

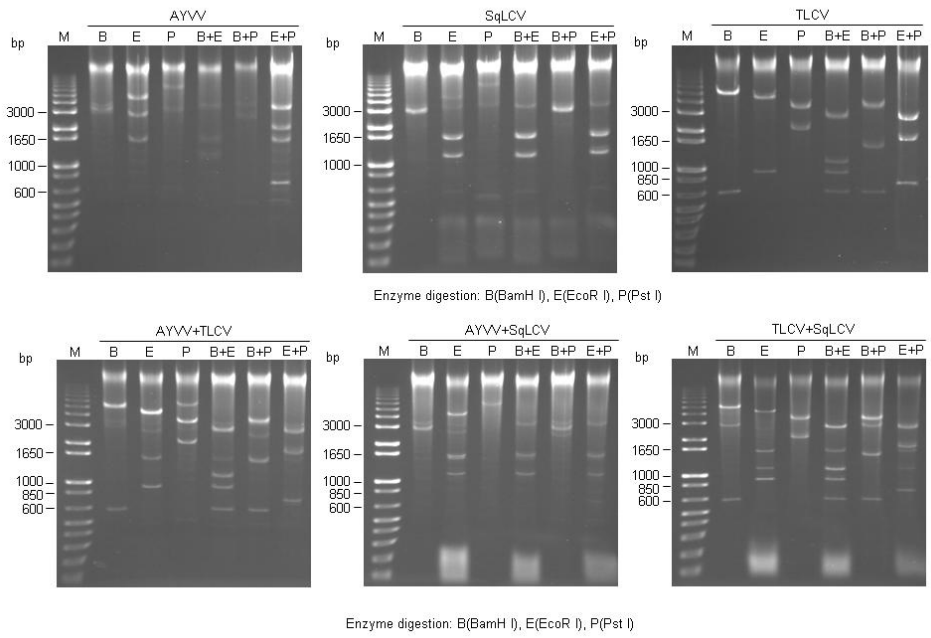
本研究主要目標為針對基因體DNA快速變異的雙生病毒，研發方便、靈敏、準確的檢測方法，並探討雙生病毒DNA序列在洋香瓜植株上或粉蝨體內的實際變化情形。

如前述，由於雙生病毒DNA序列變異極大，不適合使用需要事先知道待測目標DNA序列的檢測方法(例如聚合酶鏈反應等)，且因雙生病毒基因體為單股環狀DNA，極為適合直接作為RCA的模板，因此本研究參考Inoue-Nagata 等人(2004)及Haible等人(2006)的方法，以RCA作為檢測瓜類作物雙生病毒的工具。而為區別SqLCV與其他雙生病毒的可能複合感染，本研究將RCA產物以限制酵素*Bam*HI、*Eco*RI、*Pst*I截切，並以洋菜膠體電泳分析其產物。所使用的他種雙生病毒為田間雜草上常見的霍香薊黃脈病毒(*Ageratum yellow vein virus*, AYVV)與農民栽植於田邊的番茄上經常發現的番茄捲葉病毒(*Tomato leaf curl virus*, TLYV)。以測試RCA方法的專一性。所得結果如圖四所示，以RCA方法配合三種不同的限制酵素截切，每種病毒均有其特異性的DNA圖譜，即使在複合感染的情況下，亦能由特異性的DNA圖譜明顯區別不同雙生病毒DNA的存在。

以南方墨點雜合法確認RCA法增幅之DNA條帶

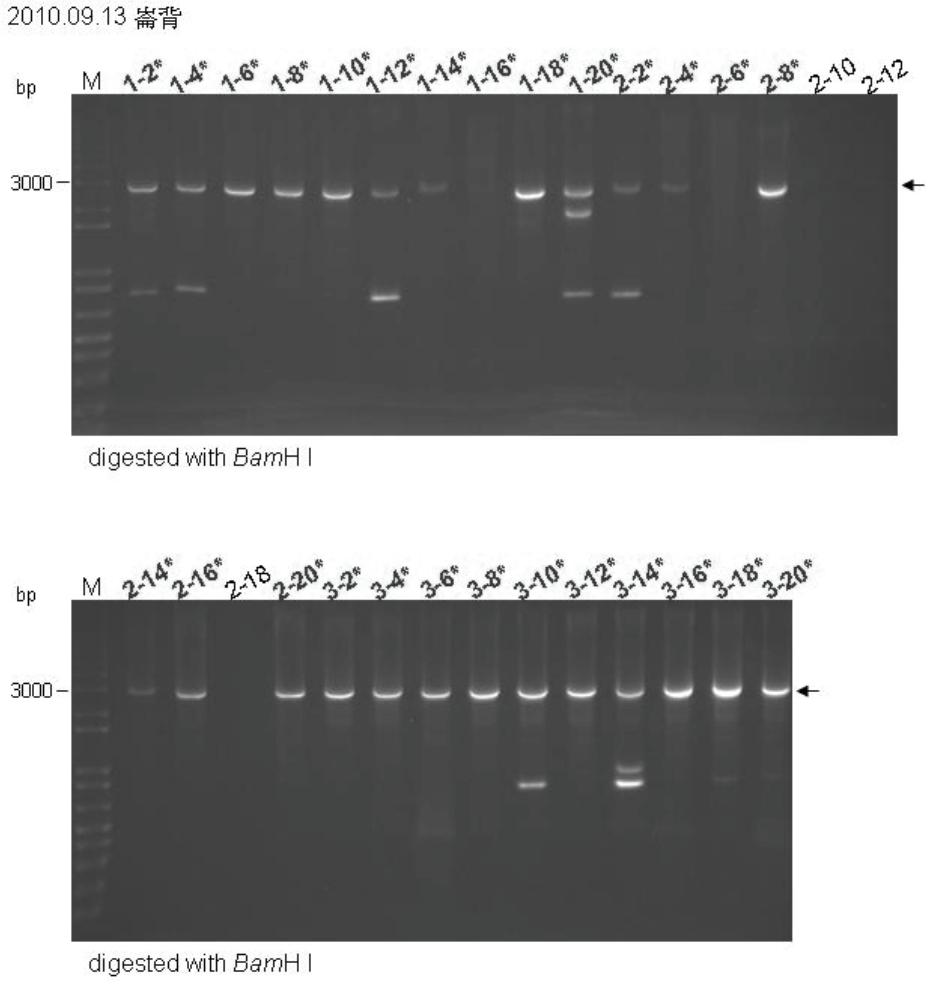
由上述實驗可知RCA法確實可適用於瓜類雙生病毒的檢測工作。本研究亦自2006年起即採用RCA法進行瓜類作物與粉蝨媒介昆蟲體內雙生病毒的監測工作。檢測的代表性結果如圖五所示，經RCA配合限制酵素*Bam*HI截切後，可在約3000 bp的位置，觀察到雙生病毒DNA A的全長基因體(圖五，箭號所指處)，並可於後續工作中直接將SqLCV全長DNA A選殖於載體中，進行核酸序列的解析與比對。

然而，在檢測過程中，經常發現除了3000 bp位置出現的全長DNA A條帶之外，會出現長度約為1000~2000 bp的DNA條帶，干擾檢測結果的判讀。由於RCA會增幅環狀DNA模板，因此植物組織或粉蝨體內的葉綠體、粒線體、或細菌的基因體與質體(plasmid DNA)皆有可能被RCA增幅，因此，為確認RCA增幅DNA條帶之正確性，本研究採用Southern blot analysis，以SqLCV外鞘蛋白基因的編碼區域作為探針，進行雜合分析。結果如圖六所示，僅有位於3000 bp位置或接近3000 bp的DNA條帶才可與探針雜合，其餘的小分子DNA條帶均不屬於SqLCV。因此，RCA法配合南方墨點雜合法分析，可正確檢測並區別瓜類作物中雙生病毒之存在。



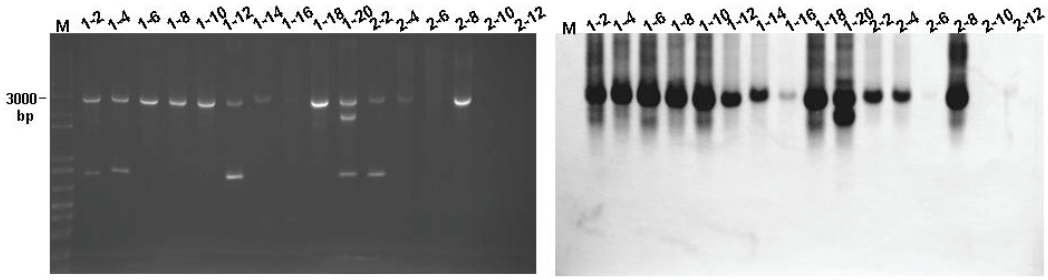
圖四、以滾環式擴增法(Rolling circle amplification, 簡稱RCA)配合三種不同限制酵素(*Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I)的剪切以檢測並區別不同種雙生病毒[霍香薊黃脈病毒(*Ageratum yellow vein virus*, AYVV)，南瓜捲葉病毒(*Squash leaf curl virus*, SqLCV)，與番茄捲葉病毒(*Tomato leaf curl virus*, TLCV)]的單獨或複合感染。

Fig. 4. Detection and differentiation of different geminiviruses by Rolling cirucle amplification coupled with restriction digestion analysis. Total DNAs extracted from plants infected singly with Ageratum yellow vein virus (AYVV), Squash leaf curl virus (SqLCV), or Tomato leaf curl virus (TLCV), or doubly with either two of the three viruses, as indicated on top of each panel, were subjected to RCA reactions according to Haible et al. (2006), followed by restriction digestion with *Bam*HI (B), EcorI (E), and PstI (P), as indicated on top of each lane, and agarose gel electrophoresis. The gels were then stained with Ethidium Bromide (EtBr) and visualized by UV illumination. The expected position of full-length SqLCV DNA A was indicated by the arrows. Molecular size markers (M) and the position of representative maker DNA band were as indicated.



圖五、以滾環式擴增法(RCA)擴增雙生病毒環狀DNA基因體，並配合*Bam*HI限制酵素檢測雲林縣崙背鄉洋香瓜葉片樣本中雙生病毒感染率之代表性結果。SqLCV全長基因體DNA預期出現的位置標示於圖右方(箭號所示)，分子量標準品(M)與3000 bp條帶之位置標示於圖左方，感染SqLCV之樣本編號以紅色字體加星號表示。

Fig. 5. Detection of SqLCV circular genomic DNAs by Rolling circle amplification (RCA) plus restriction enzyme digestion. Total DNAs extracted from muskmelon leaf samples were subjected to RCA reactions according to Haible et al. (2006), followed by restriction digestion with *Bam*HI and agarose gel electrophoresis. The gels were then stained with EtBr and visualized by UV illumination. The expected position of full-length SqLCV DNA A was indicated by the arrows. Molecular size markers (M) and the position of 3000 bp DNA band were as indicated. The identities of each sample were indicated on top of each lane. Samples infected with SqLCV were shown with red fonts plus a star sign, *.



圖六、以南方墨點雜合法確認RCA偵測法之可信度。

Fig. 6. Confirmation of results of Rolling Circle Amplification (RCA) by Southern blot analysis. Total DNAs extracted from muskmelon leaf samples were subjected to RCA analysis [11], followed by digestion with the restriction enzyme BamHI. The reactants were analyzed by electrophoresis through a 1 % agarose gel and visualized by eithidium bromide staining and UV illumination (Left panel). The same gel were then subject to Southern blot analysis using DIG-labeled DNA probes specific to DNA A of SqLCV (Right panel). The identities of each sample were indicated on top of each lane. M, molecular size marker (1kb Ladder, New England BioLab). The expected position of the full-length DNA A component of Squash leaf curl virus was indicated by the arrows on the right.

目前各研究單位普遍採用之植物病毒檢測方法包括酵素連結免疫吸附法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)、免疫擴散沉澱法 (Immuno-diffusion)、聚合酶鏈反應法(Polymerase chain reaction, PCR)、光學、與電子顯微鏡檢測法、或核酸探針及各式墨點法(Southern blot, northern blot, western blot analyses)等，在操作之速度及簡便性、試劑之敏感性與專一性、經濟性等方面均仍有極大之改進空間，且因雙生病毒在植物中含量低，以傳統檢測方法極難偵測雙生病毒。在有限的幾個血清偵測的例子，均顯示很高的交互反應，而無法區分相近或相遠的病毒。直到核酸分子選殖、核酸雜配及聚合酵素連鎖反應、核酸定序比對等分子生物學技術的應用，雙生病毒才能被準確的偵測和鑑定[6,8,10,15,20,25]。在國內，農業試驗所的關博士研究團隊亦研發出利用LAMP(Loop-mediate isothermal amplification)技術以快速檢測SqLCV (Kuan et al., 2010)這些技術也同時能回答這些病毒的流行病學及遺傳岐異度及分子演化的關係，但是其相對價格、操作困難

度、與實驗室所需設備價格(如PCR溫度循環設備)均較為高昂，且受限於必須事先知道待測物的核酸序列以設計合成引子或探針，較不利於應用在基因體DNA快速變化的雙生病毒之檢測。而本研究採用的RCA法配合限制酵素截切與南方墨點雜合分析，在步驟上雖較為複雜，但其反應皆可在恆溫下進行，且較不受病毒DNA點突變的影響，亦不需事先得知檢測標的物的DNA序列，在操作方便性與結果的正確性極靈敏度方面，具有較大的優勢。

應用RCA法進行瓜類作物與粉蝨體內雙生病毒之間測工作

本研究應用上述所研發的RCA方法進行台灣中南部地區瓜類作物SqLCV感染率與粉蝨體內SqLCV帶毒率的監測工作。其中2010年1月至10月在雲林縣二崙與崙背鄉等栽培區的監測工作結果，整理統計後呈現於表一。經由田間監測與調查工作，發現雲林地區全年均有大面積的洋香瓜或甜瓜的種植。因此SqLCV全年可以持續存在於田間瓜類作物或粉蝨體內，並可在冬季裡作時台南地區開始栽培洋香瓜時，經由北風往南吹襲，即成為台南地區瓜田的初級感染源。因此SqLCV在台灣地區已經成為類似風土病害，無法採用Salati等人(2002)在多明尼加共和國所採行的辦法，經由長時間(三個月以上)清除茄科作物，而有效降低番茄捲葉病害危害。

另外，此監測工作亦發現越瓜(*Cucumis melo* var. *conomon*)與冬瓜(*Benincasa hispida*)感染SqLCV的感染率極高，而此二作物在田間係長時間(數月)栽培，因此極可能為SqLCV的越冬宿主(Reservoir hosts)，在洋香瓜等作物收成後，提供SqLCV持續複製。而在所有檢測的瓜類作物中，西瓜(*Citrullus vulgaris*)的SqLCV感染率最低。

SqLCV基因體DNA序列親緣關係分析

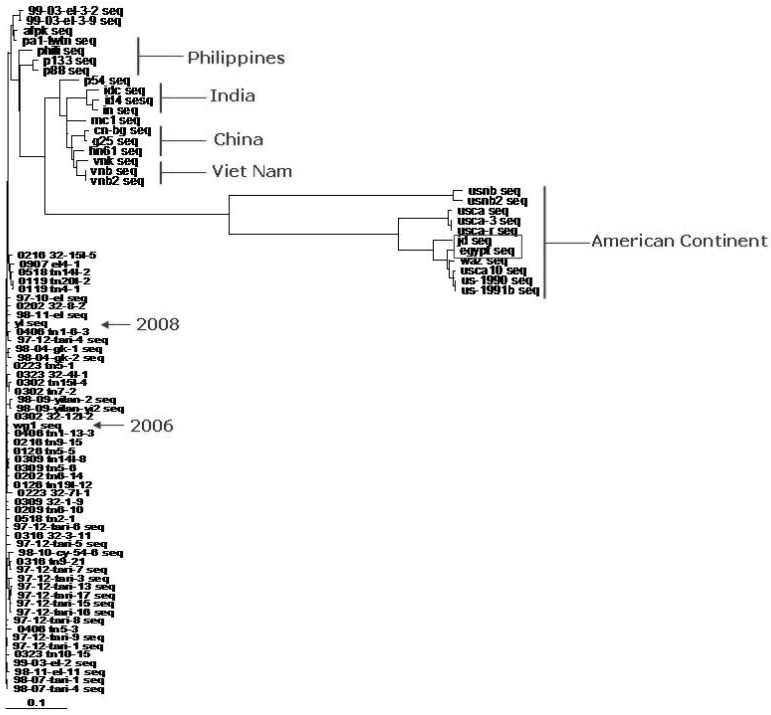
為明瞭台灣地區SqLCV之可能來源及其與世界其他地區瓜類雙生病毒間的親緣關係。本研究自GenBank基因庫[(4)]中選擇30株世界各地區已知感染瓜類作物的雙生病毒之基因體DNA A全長序列，與本研究於2006至2010年期間選殖並定序的57株SqLCV基因體DNA A全長序列，進行親緣關係分

析。結果如圖七所示，SqLCV基因體序列之分群與其地理位置有極大的關聯性，台灣地區所分離到的SqLCV株系，不論寄主植物，幾乎全部屬於相同的分群。僅有二株(99-03-el-3-2, 99-03-el-3-9)被歸類於東南亞的分群，顯示在台灣地區的SqLCV已經成為本土性的病毒株系，可與外國株系明顯區別。

表一、2010 年 1 月至 9 月期間南瓜捲葉病毒(*Squash leaf curl virus*)於二崙、崙背地區瓜類作物感染率與粉蝨帶毒率之監測結果統計表

Table 1. Incidence of *Squash leaf curl virus* infections in various cucurbits and viruliferous ratio of whiteflies in Erlun and Lunbei areas from January to September, 2010.

Crop species	Leaf samples			Whitefly samples		
	Total number	RCA (+)	Disease incidence	Total number	RCA (+)	Viruliferous ratio
Cucumis melo var. *reticulatus* (洋香瓜)	740	489	66.1%	669	245	36.6%
Citrullus vulgaris (西瓜)	190	37	19.4%	100	16	16%
Cucumis melo var. *Makuwa* (香瓜)	30	16	53%	10	7	70%
Cucumis melo var. *conomon* (越瓜)	40	37	92.5%	10	2	20%
Benincasa hispida (冬瓜)	30	22	73.3%	ND	ND	ND



圖七、台灣中南部地區採集的SqLCV基因體DNA A 核酸序列與GenBank基因庫(Benson et al., 2010)中各地區瓜類雙生病毒基因體DNA A代表性序列之親緣關係分析。

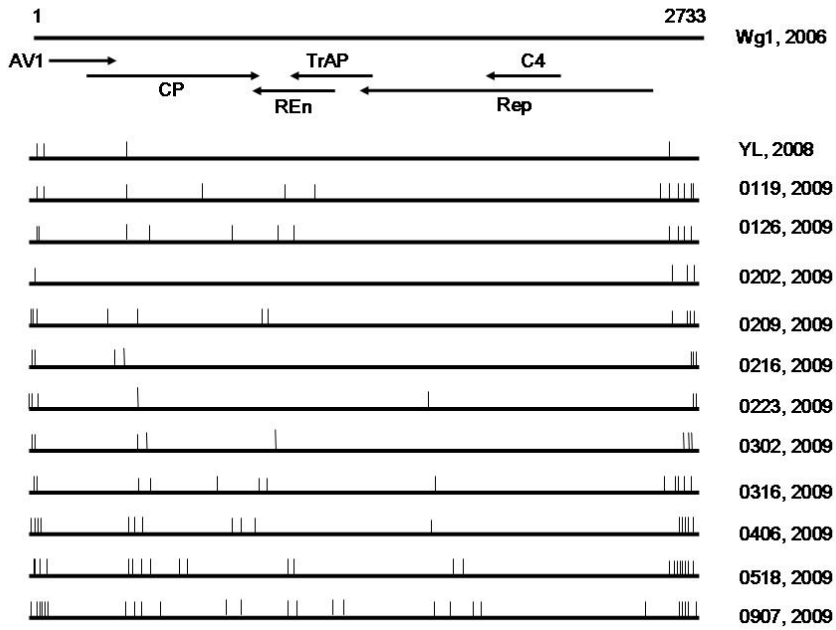
Fig. 7. Complete DNA-A sequences of 30 representative geminiviruses isolated from cucurbits were retrieved from GenBank [(4)] and used in the phylogenetic analysis with those of 57 local isolates collected during 2006 to 2010 period. The programs PileUp and PaupSearch in the GCG Package (Accelrys Inc.) were used in the phylogenetic analyses using default parameters. The "distance" criterion was used in the reconstruction and evaluation of the phylogenetic tree. The names, accession numbers, species (abbreviations), and the locality of sequences, respectively, were listed as the following: P133.seq, EU487041, *Squash leaf curl Philippines virus* (SqLCPV) isolate P133, Philippines; P88.seq, EU487033, SqLCPV isolate P88, Philippines; P54.seq, EU487031, *Squash leaf curl China virus* (SqLCCNV) isolate P54, Philippines; Wg1.seq, EU310406, *Squash leaf curl Philippines virus* isolate Wg1, Taiwan;JD.seq, EF532620, *Squash leaf curl virus* (SqLCV), Jordan; YL.seq, EU479710, SqLCV isolate YL, Yunlin, Taiwan;VNB.seq, NC_007339, SqLCCNV-[B], Viet Nam; In.seq, EU573715, *SqLCCNV*- [Pumpkin:Varanasi], Northern India; USCA.seq, DQ285014, *Squash mild leaf curl virus* isolate 4, California, USA; USCA-R.seq, AF421552, *Squash mild leaf curl virus*-[Imperial Valley], California, USA; USNB.seq, AF110189, *Bean calico mosaic virus*, Nebraska, USA; Idc.seq,

AY184487, SqLCCNV -[Pumpkin:Coimbatore], India; USCA10.seq, DQ285016, SqLCV isolate 10, Imperial Valley, California, USA; VNB2.seq, AF509743, SqLCCNV -[B], Viet Nam; VNK.seq, AF509741, SqLCCNV -[K], Viet Nam; US-1990.seq, M38183, SqLCV, USA; USNB2.seq, NC_003504, *Bean calico mosaic virus*, Nebraska, USA; USCA-3.seq, NC_004645, *Squash mild leaf curl virus*-[Imperial Valley], California, USA; US-1991b.seq, NC_001936, SqLCV, USA; Phili.seq, AB085793, SqLCPV, Philippines; Id4.seq, DQ026296, SqLCCNV -[Pumpkin: Lucknow], North India; MC1.seq, EF197940, SqLCCNV isolate MC1, Malaysia; AFPK.seq, EF199774, SqLCPV -[Taiwan] isolate AFPK5slv, Shanhua, Taiwan; PA1-TWTn.seq, DQ866135, SqLCPV isolate PA1, Tainan, Taiwan; G25.seq, AM260206, SqLCCNV isolate G25, China; Hn61.seq, AM260205, SqLCCNV isolate Hn61; Egypt.seq, DQ285019, SqLCV isolate Cairo, Egypt; WAZ.seq, AF256203, SqLCV strain SLCV-WAZ, Arizona, USA; CN-Bg.seq, AB027465, SqLCCNV, China. For isolates identified in this study, two- or four-digit numbers were used to identify the year (in Republic of China Calendar year) or the month and date (isolated in year 2009) of collection of each isolate, respectively. The length of the scale bar represents the distance of 0.1 substitutions per site.

SqLCV基因體變異性分析

為了解SqLCV基因體之變異性，本研究持續自台南地區的定點採樣田採集SqLCV樣本，進行選殖與定序分析。經與廖等人(2007)所首次發現的台灣SqLCV-Wg1序列進行比對分析，發現每週所採集的樣本即有約1~2%的核苷酸變異，變異速度極為快速，遠高於Duffy 與Holmes(2008)所報導的TYLCV之變異速度。而在不同時空環境下經常發生變異的核苷酸位置較常出現於基因間隙區域(intergenic region)與外鞘蛋白(coat protein)編碼區域中。而其他基因體區域相對較為穩定。

雙生病毒基因體具有極高的變異性[7,9,12,19]。且在變異後，可逃避某些專一性的檢測方法之偵檢，並可能出現具有高度致病性、或可突破當前抗病品種的突變病毒株系，並因而造成新流行病害的大發生[5,7,21,24,26]。因此，防檢疫工作相關單位必須持續注意此種病毒基因體DNA快速變化的情形。



圖八、SqLCV基因體DNA A序列之變異性分析。於2009年洋香瓜栽培季節持續追蹤、比對分析自台南地區固定監測田所採集的SqLCV樣本之基因體DNA A核酸序列，以明瞭SqLCV基因體之變異性。

Fig. 8. Temporal variations of nucleotide sequences of SqLCV genomic DNA A component. During the 2009 growing seasons of muskmelons, SqLCV samples were continuously collected from the same location in Tainan. The nucleotide sequences of DNA A component of each sample were compared to those of the reference sequences of SqLCV-Wg1 (shown on top of the figure, with the positions and translational directions of each gene indicated by the arrows) and SqLCV-YL, using the Gap program in the GCG Package (Accelrys Inc.). The numbers on the right of each sequence indicate the month, date, and year of the collection. Differences with the reference sequence SqLCV-Wg1 were indicated by the vertical bars.

結論與展望

本研究已研發以RCA方法檢測微量樣本中雙生病毒基因體DNA的標準操作程序。此方法在防檢疫相關工作的應用性，包括下列數方面:1.用於區別真正病毒感染或是由非生物因子(Abiotic factors)所造成的病徵。可提供栽

種者資訊，以決定是否需要及早將可疑植株拔除；2.可協助追蹤病害或蟲害之防治成效，並進而減少用藥次數，降低生產成本；3.可協助農民選擇適合種植的地點與時間，並了解田間附近的可能感染源；4.協助政府相關單位及民意代表隨時掌控田間病毒病害流行之狀況。

SqLCV普遍存在於田間瓜類作物與粉蝨族群中，但基因體變異性極大，其變異速度亦即快速，大於TYLCV之變異速度。而粉蝨的帶毒率與植株感染率隨作物種類而不同，其中以西瓜最低，但越瓜與冬瓜即可能擔任越冬寄主的角色。

SqLCV基因體之變異，較常出現於基因間隙區域(intergenic region)與外鞘蛋白(coat protein)編碼區域中。而其他基因體區域相對較為穩定。此種變異對於診測方法與抗病品種的開發，具有極大的影響。

預期本研究的結果將可應用於洋香瓜等瓜類作物的抗病育種與栽培管理工作，作為用於追蹤雙生病毒來源與設計有效病毒防治策略的參考工具，並增進洋香瓜產業之經濟效益。

謝　　辭

本研究工作承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局計畫” 98農科-9.3.1-檢-B2(5)、98農科-9.1.2-檢-B1(5)、99農科-9.1.2-檢-B1(Z)”經費支持，以及雲林縣二崙鄉廖英旭先生、崙背鄉李應期先生、台南縣將軍鄉農會吳明成股長、黃萬預先生、台南市農會林重興理事等人與許多相關單位同仁提供寶貴意見與實驗上的協助，特此致上無限謝忱。

引用文獻

1. 王堂凱，彭瑞菊，鄭櫻慧。2007。台灣洋香瓜田間病毒相動態及媒介昆蟲帶毒率分佈之流行病學研究。行政院及所屬各機關出國報告。
2. 林鳳琪、蘇宗宏、王清玲。1997。溫度對銀葉粉蝨發育與繁殖之影響及其在聖誕紅上之發生。 中華昆蟲17: 66-79。

3. 鄧汀欽，蔡錦慧，廖吉彥。2005。瓜類種子傳播病毒病害的特性。植物種苗 7:1-19。
4. Ali, M., Z. Ahmad, M. Tanveer, and T. Mahmood. 1995. Cotton Leaf Curl Virus in the Punjab. Current Situation and Review of Work. Multan, Pakistan: Cent. Cotton Res. Inst./Pak. Minist. Food, Agric. Livest./Asian Dev. Bank. 117pp.
5. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. & Sayers, E. W. 2010. GenBank. Nucleic Acids Res 38: D46-51.
6. Briddon, R. W., Prescott, A. G., Lunness, P., Chamberlin, L. C. L.,and Markham, P. G. 1993. Rapid production of full-length, infectious geminivirus clones by abutting primer PCR(AbP-PCR). J. Virol. Methods 43:7-20.
7. Bull, S. E., R. W. Briddon, W. S. Sserubombwe, K. Ngugi, P. G. Markham, and J. Stanley. 2006. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. J Gen Virol. 87:3053-65.
8. Caciagli, P., and Bosco, D. 1997. Quantitation over time of tomato yellow leaf curl geminivirus DNA in its whitefly vector. Phytopathology 87:610-613.
9. Duffy, S. and Holmes, E. C. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus Tomato yellow leaf curl virus. J. Virol. 82:957-65.
10. Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Martinez, R. T., Leong, S. A., Faria, J. C., Morales, F., and Maxwell, D. P. 1991. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. Plant Dis. 75:336-342.
11. Haible, D., Kober, S., Jeske, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. J. Virol. Methods 135:9-16.

12. Harrison, B. D., and D. J. Robinson. 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). Annual Review of Phytopathology. 37:369-98.
13. Huang, L. H., Tseng, H. H., Li, J. T., and Chen, T. C. 2010. First Report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* Infecting Cucurbits in Taiwan. Plant Dis. 94:1168.
14. Inoue-Nagata, A. K., Albuquerque, L. C., Rocha, W. B., and Nagata, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. J Virol Methods 116: 209-11.
15. Kuan, C. P., Wu, M.T., Lu, Y. L., and Huang H. C. 2010. Rapid detection of squash leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification. J. Virol. Methods 169:61-65.
16. Liao, J. Y., Hu, C. C., Lin, T. K., Chang, C. A., and Deng, T. C. 2007. Identification of Squash leaf curl Philippines virus on *Benincasa hispida* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 16, 11-18.
17. Legg, J. P., and C. M. Fauquet. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. Plant Mol Biol. 56:585-99.
18. Lovisolo, O. 1980. Virus and viroid diseases of cucurbits. Acta Horticulturae 88:33-82.
19. Nawaz-ul-Rehman, M. S., and C. M. Fauquet. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. FEBS Lett. 583:1825-32.
20. Navot, N., Ber, R., and Czosnek, H. 1989. Rapid detection of tomato yellow leaf curl virus in squashes of plants and insect vectors. Phytopathology 79:562-568.
21. Pita, J. S., V. N. Fondong, A. Sangare, G. W. Otim-Nape, S. Ogwal, and C. M. Fauquet. 2001. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. J Gen Virol. 82:655-65.

22.Salati, R., Nahkla, M. K., Rojas, M. R., Guzman, P., Jaquez, J., Maxwell, D. P., and Gilbertson, R. L. 2002. Tomato Yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. Phytopathology 92:487-496.

23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. A. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.

24. Thresh, J. M., G. W. Otim-Nape, J. P. Legg, and D. Fargette. 1997. African cassava mosaic virus disease: the magnitude of the problem. Afric. J. Root Tuber Crops. 2:13-19.

25. Wyatt, S. D., and Brown, J. K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology 86:1288-1293

26. Zhou, X., Y. Liu, L. Calvert, C. Munoz, G. Otim-Nape, D. Robinson, and B. Harrison. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. J Gen Virol. 78:2101-2111.

ABSTRACT

Survey of incidences and analysis of genomic variations of Squash leaf curl virus in cucurbit crops in southern and central Taiwan

Jye-Yann Liao[1], Ting-Chin Deng[1], Feng-Chyi Lin[2], Li-hsin Huang[3], Jui-Chu Peng[4], Tsung-Chi Chen[5],Yi-Chin, Lai[6], Hsing-Hong Chen[6], Ming-Yen Song[6], and Chung-Chi Hu[6,7]

[1] Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

[2] Applied Zoology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

[3] Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

[4] Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan.

[5] Department of Biotechnology, Asia University, Taiwan

[6] Graduate Institute of Biotechnology, National Chung-Hsing University

[7] Corresponding author, Email: cchu@dragon.nchu.edu.tw

Cucurbits are economically important crops in Taiwan. However, several emerging viral diseases have devastated the production of cucurbits and caused great losses in recent years. *Squash leaf curl virus* (SqLCV, Geus *Begomovirus* , Family *Geminiviridae*), transmitted by whiteflies (*Bemisia tabaci* species complex) is among the most severe viral pathogens in cucurbits. The development of efficient and convenient methods for the monitoring of SqLCV in cucurbits is in need. In this study, modified rolling circle amplification (RCA) method to detect the circular DNA genome of SqLCV was developed and applied in the survey of SqLCV in whiteflies and cucurbit crops in the major production areas in southern and central Taiwan. The results revealed the common and persistent presence of SqLCV among various cucurbit crops and whitefly populations. The disease incidences and viruliferous ratios varied

widely among different crops and whitefly populations, with watermelon and muskmelon being the lowest and highest, respectively. The spatial and temporal effects on the variations of SqLCV genomic sequences were further analyzed using samples collected from various localities in Taiwan over the period of 2007 to 2010. Most genomic variations were identified in intergenic region and coat protein coding sequences, while the Rep coding sequences were highly conserved. These results provide applicable references for the tracing of origins of SqLCV isolates and the design of effective disease management measures for SqLCV.

Key words：Cucurbits, leaf curl disease, geminiviruses, genome, rolling circle amplification