

使用即時定量 RT-PCR 於瓜類褪綠黃化病毒檢驗之評估

關政平^{1,*} 林育昌² 曾清山¹ 鄭櫻慧³ 鄧汀欽⁴

摘要

關政平、林育昌、曾清山、鄭櫻慧、鄧汀欽。2015。使用即時定量 RT-PCR 於瓜類褪綠黃化病毒檢驗之評估。台灣農業研究 64(3):204–212。

本研究依據瓜類褪綠黃化病毒 (*Cucurbit chlorotic yellows virus*; CCYV) 之鞘蛋白 (coat protein) 基因設計專一性引子對，並利用 real-time RT-PCR 與 TaqMan 螢光探針，建立瓜類褪綠黃化病毒的檢測技術，同時進行田間洋香瓜和南瓜是否感染 CCYV 之測試。結果顯示，本研究所開發之 real-time RT-PCR 檢測方法的靈敏度，相較於一般 RT-PCR 提高約 100–1,000 倍，並可在感病洋香瓜和南瓜上專一性的偵測到 CCYV，與其他瓜類病毒及健康的植株並無反應。本檢測方法亦運用於分析田間感染 CCYV 洋香瓜試驗。此 real-time RT-PCR 具有專一性佳及靈敏度高之優點，未來可將本技術應用於評估瓜類作物是否感染 CCYV。

關鍵詞：瓜類褪綠黃化病毒、分子偵測、及時反轉錄聚合酶鏈鎖反應。

前言

瓜類褪綠黃化病毒 (*Cucurbit chlorotic yellows virus*; CCYV) 為 *Closteroviridae* 科，*Crinivirus* 屬之長絲狀病毒，基因體由兩條正單股 RNA 所組成，分別命名為 RNA1 及 RNA2。2004 年首次發現於日本，並確認其分類地位 (Ueda *et al.* 2006; Gyoutoku *et al.* 2009; Okuda *et al.* 2010)。其後在中國、蘇丹等地皆有發現的記錄 (Gu *et al.* 2011; Hamed *et al.* 2011; Zeng *et al.* 2011)。台灣則在 2009 年於雲林發現洋香瓜感染 CCYV (Huang *et al.* 2010)。CCYV 病毒可藉煙草粉蝨以半永續性方式傳播，危害多種作物。宿主範圍包括甜瓜、胡瓜、南瓜、西瓜等葫蘆科作物 (Wisler *et al.* 1998a; Wisler *et al.* 1998b; Gyoutoku *et al.* 2009)。感染初期植株葉片產生小型黃斑，病斑逐漸擴大形成綠色嵌紋病徵，影響果實產量與品質 (Gyoutoku *et al.* 2009)。目前

根據血清免疫學所發展之酶連抗體免疫標誌法 (the enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) (Dietzgen & Thomas 1991; Kubota *et al.* 2011)，及反轉錄聚合酶鏈鎖反應法 (RT-PCR) (Gyoutoku *et al.* 2009) 等已被廣泛應用於檢測植物 RNA 病毒。

本篇研究目的主要是利用 CCYV 鞘蛋白 (coat protein; CP) 基因設計專一性核酸探針，並於其兩端標定螢光物質，以便應用 TaqMan 及時反轉錄聚合酶鏈鎖反應反應 (real-time RT-PCR) 建立快速檢測技術，並探討檢測專一性與靈敏度及檢測樣品是否帶有 CCYV 病毒。

材料與方法

病毒來源

由台中地區洋香瓜田收集疑似感染 CCYV 植株，經 RT-PCR 及定序方法確認為病毒感

投稿日期：2014 年 11 月 18 日；接受日期：2015 年 2 月 11 日。

* 通訊作者：pcr123@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

染後，使用磷酸鉀緩衝液 (0.05 M, pH 7.5) 研磨均質後，經汁液接種於葵藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 單斑分離及增殖於矮南瓜。其餘使用之對照病毒，包括 CMV (*Cucumber mosaic virus*)、CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*)、PRSV-W (*Papaya ringspot virus-W*)、ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) 病毒分離株皆為行政院農業委員會農業試驗所保存。

植株全 RNA 的抽取純化

取 0.1 g 新鮮葉片或 0.05 g 冷凍乾燥葉片，置於液態氮中研磨，並參照廠商所提供之操作手冊以 TriSolution Reagent Plus (GeneMark, Taiwan) 抽取全 RNA，抽取完成的全 RNA 保存於 -80°C 待後續試驗使用。

Real-time RT-PCR 引子的設計

Real-time RT-PCR 引子是藉由 Primer Express™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 軟體所設計，核酸引子合成則是委託 Bio Basic 公司 (Bio Basic Inc., Canana) 所合成。引子 (CCYV-cp-Q0330-117-F/R，如表 1 所示) 專一性結合於 CCYV RNA2 的 CP 基因序列 (GeneBank accessions AB523789)，結合的序列位置分別為第 5,447–5,469 及 5,545–5,563 個核苷酸，產物預期為 117 bp。此段 RT-PCR 擴增序列包含專一性螢光探針 CCYV-0510-probe 表 1 的結合序列，以確保核酸擴增時，專一性螢光探針因聚合酶分解而產生螢光，以利 real-time RT-PCR 機器偵測螢光訊號。

TaqMan 螢光探針的設計

TaqMan 螢光探針序列 CCYV-0510-probe

(表 1) 是藉由 Primer Express™ (Applied Biosystems) 軟體所設計，並委託 Biosearch Technologies (Novato, CA, USA) 合成。可專一性結合於 CCYV RNA2 的 CP 基因序列 (GeneBank accessions number AB523789)，結合的序列位置為第 5,487–5,508 個核苷酸。其 5' 和 3' 端分別標定螢光物質 FAM (6-carboxy fluorescein excitation wavelength = 494 nm) 及 BHQ1 (excitation wavelength = 534 nm)。

建立 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 方法

本試驗所使用的 RT-PCR 藥劑為 Access-Quick RT-PCR System (Promega, Madison, WI, USA)，反應物包括 AccessQuick Master Mix (2×) 12.5 μL、0.1 μM CCYV-cp-Q0330-117-F/RCCYV-cp-Q0330-117-R 引子、2 μL 植物全 RNA 反應體積為 25 μL。反應條件為：45°C 45 min、95°C 3 min、40 個循環的 95°C 30 s、52°C 30 s 和 72°C 30 s、72°C 5 min 和 16°C 定溫。Real-time RT-PCR 所使用的試劑套組為 KAPA PROBE FAST Universal One-Step real-time RT-PCR Kit (KAPA BIOSYSTEM, Woburn, MA, USA)。在 20 μL 的反應體積中，加入的反應物分別為：KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2×) 10 μL、0.1 μM CCYV-cp-Q0330-117-F/CCYV-cp-Q0330-117-R、0.75 μM CCYV-0510-probe、dUTP (10 mM) 0.4 μL、ROX Low (50×) 0.4 μL、KAPA RT Mix (50×) 0.4 μL、2 μL 植物全 RNA。反應條件為：42°C 5 min、95°C 3 min、40 個循環的 95°C 3 s、52°C 30 s 和 60°C 33 s。Real-time RT-PCR 反應偵測機器為 ABI PRISM® 7500

表 1. 本試驗所使用之核酸引子與核酸探針。

Table 1. The primers and fluorescent nucleic acid probes used in this experiment.

Primer/Probe name	Sequence (5'–3')	T _m (°C)	Primer location ^z	Primer size (bp)
CCYV-cp-Q0330-117-F	GTCAGATATTGAAATCTTAAAG	52	5,447–5,469	23
CCYV-cp-Q0330-117-R	GAACCATTAACGTAATCAG	52	5,545–5,563	19
CCYV-0510-probe	FAM-AGCGACCATCATCTACAGGCAA-BHQ1 ^y	58	5,487–5,508	22

^z Primer location based on GenBank Accession number: AB523789.

^y FAM: the 5'-end of probe was labeled with 6-carboxy-fluorescein; BHQ1: the 3'-end of the probe was labeled with Black Hole Quencher-1.

Sequence Detection System (Applied Biosystems USA)。

RT-PCR 和 real-time RT-PCR 的專一性測定

為確定所設計的引子和探針序列是否對 CCYV 序列具專一性，以 3 組健康植株 (洋香瓜、西瓜、南瓜) 和 5 組感染不同病毒植株 (CGMMV、CMV、PRSV、ZYMV 和 CCYV) 所抽取的全 RNA 進行 RT-PCR 以及 real-time RT-PCR 反應，其反應物及條件如前述。

CCYV 靈敏度檢測試驗

為測定所設計的探針發展之 real-time PCR 對 CCYV 病毒檢測的靈敏度，本研究應用胞外轉錄 (*in vitro* transcription) 技術製備 CCYV 之 CP RNA 將 CCYV 所感染的病株全 RNA，以 CCYV-cp-753-F (5'-ATGGAGAAGACT-GACAATAAACAAA-3') 和 CCYV-cp-753-R (5'-TTATTACTACAACCTCCCGGTG-3') 引子進行 PCR 反應，反應條件為：95°C 3 min、40 個循環的 95°C 30 s、55°C 30 s 和 72°C 30 s，72°C 5 min 和 16°C 定溫，將所擴增的片段選殖於載體 pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA)，並轉型於 *Escherichia coli* JM 109 (Promega, Madison, WI, USA) 重組載體 DNA 以 Gene-Spin DNA extraction kit (波仕特，台灣) 抽取純化，再以 T7 RNA 聚合酵素 (Promega, Madison, WI, USA) 進行胞外轉錄反應，依照 RiboMax large-scale RNA production system (Promega, Madison, WI, USA) 建議操作，反應物經 DNase I 處理後，最後以 RNA 純化套組純化 RNA 並且溶解於 DEPC 水。將經由胞外轉錄技術製備 CCYV CP RNA 片段以 10 倍序列稀釋，由 100 ng μL^{-1} (相當於 9.8×10^{10} copy 數) 稀釋至 9.8×10^{-1} copy 數和 NTC (No Template Control)，另外也以 CCYV 感染植株之全 RNA 做偵測，植物全 RNA 之純化，RT-PCR 及 real-time RT-PCR 反應條件悉如前述。

田間植株的 CCYV 病毒檢測

採集田間植株洋香瓜 (18 個) 和南瓜 (11

個) 植株材料，取葉片組織約 0.1 g，植物全 RNA 的抽取純化，及以 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 進行 CCYV 病毒檢測均依照前面所述步驟。

結果

CCYV 引子對和探針的設計及其專一性測定

為設計可專一性檢測 CCYV 病毒的核酸引子對和探針，本試驗比對 CCYV 病毒序列，利用 CCYV RNA2 的 CP 基因高保留區段設計了引子 CCYV-cp-Q0330-117-F 及 CCYV-cp-Q0330-117-R 和探針 CCYV-0510-probe (表 1)。

RT-PCR 和 real-time RT-PCR 於 CCYV 的專一性測定

為確定這些引子對和探針對 CCYV 是否具專一性，我們以 RT-PCR 方法，分別針對健康洋香瓜、健康南瓜、CMV 感染洋香瓜植株、CGMMV 感染洋香瓜植株、PRSV-W 感染洋香瓜植株、ZYMV 感染洋香瓜植株、CCYV 感染洋香瓜植株 (CCYV-1) 和 CCYV 感染南瓜植株 (CCYV-2) 的全 RNA 進行 RT-PCR 反應，並含未添加植物 RNA 的反應 (NTC) 作為負對照組。瓊脂凝膠電泳分析顯示，僅 CCYV 感染的洋香瓜植株 (CCYV-1) 和南瓜植株 (CCYV-2) 這兩組產生 117 bp 產物之核酸片段，對其他瓜類病毒如 CMV、CGMMV、PRSV-W、ZYMV 感染之植株及健康的洋香瓜與南瓜，與作為負對照組一樣皆無擴增產物 (如圖 1A)，顯示本試驗設計的引子具有專一性。再以 real-time RT-PCR 方法進行試驗，結果顯示只有在 CCYV 感染洋香瓜或南瓜之組織呈現正反應 (圖 1B)，Ct 值為 21.9 及 23.0，而被其他瓜類病毒如 CMV、CGMMV、PRSV、ZYMV 感染之植株，及健康的洋香瓜與南瓜，與負對照組類似皆無反應。經由上述試驗顯示，所設計的引子和探針於 real-time RT-PCR 方法試驗，皆對 CCYV 病毒基因片段具有專一性。

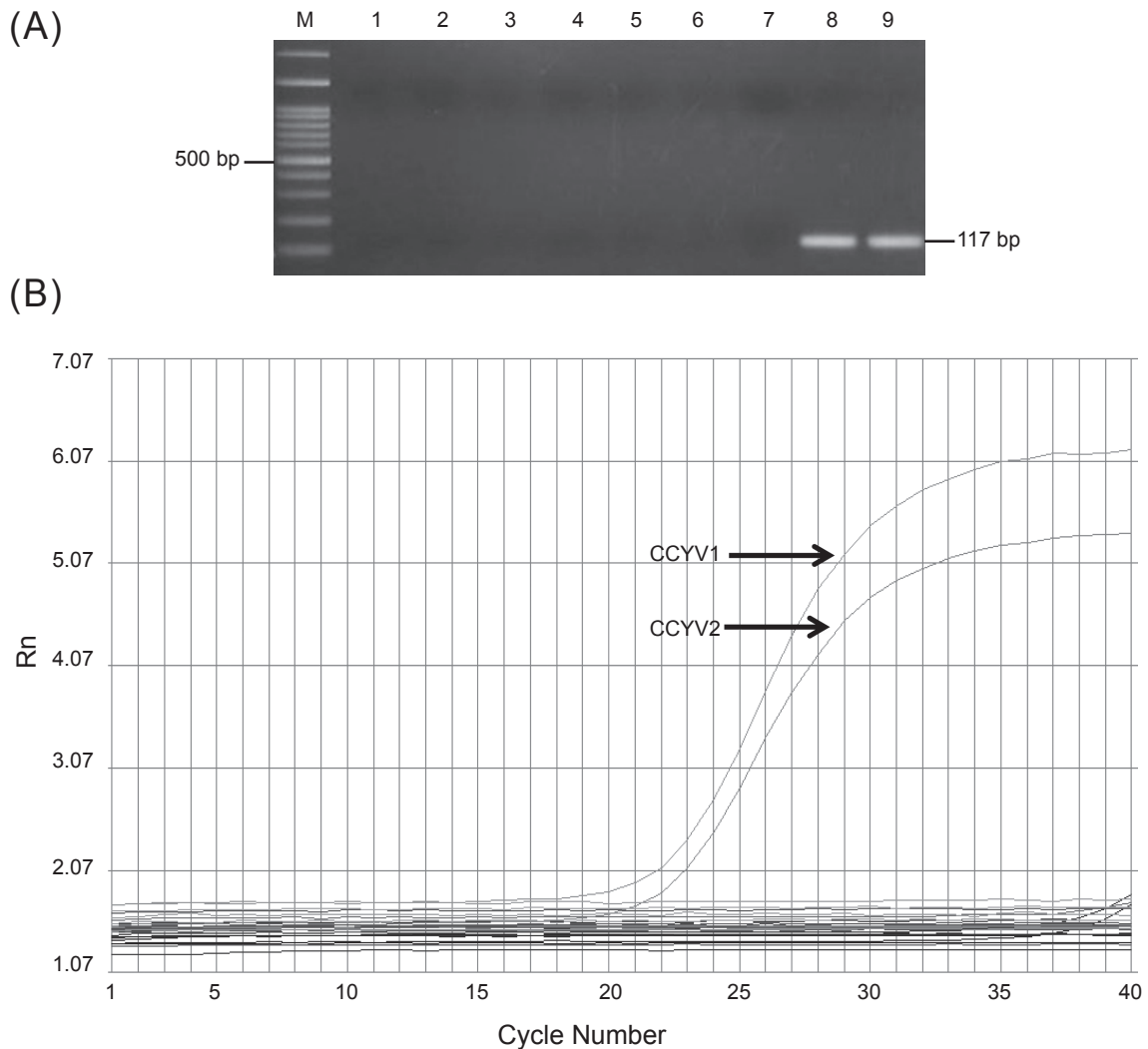


圖 1. 利用 RT-PCR (A) 和 real-time RT-PCR (B) 方法檢測 CCYV 的專一性試驗。行 1：NTC (無核酸模板對照組)；行 2：健康洋香瓜；行 3：健康南瓜；行 4：CMV 感染洋香瓜；行 5：CGMMV 感染洋香瓜；行 6：PRSV-w 感染洋香瓜；行 7：ZYMV 感染洋香瓜；行 8：CCYV-1 感染洋香瓜；行 9：CCYV-2 感染南瓜；行 M：100 bp ladder。

Fig. 1. Specificity of RT-PCR (A) and real-time RT-PCR (B) for detection of CCYV. Lane 1: NTC (No Template Control); Lane 2: healthy melon; Lane 3: healthy squash; Lane 4: CMV-infected melon; Lane 5: CGMMV-infected melon; Lane 6: PRSV-w infected melon; Lane 7: ZYMV-infected melon; Lane 8: CCYV-1-infected melon; Lane 9: CCYV-2-infected squash; and Lane M: 100 bp ladder.

Real-time RT-PCR 於 CCYV 檢測靈敏度試驗

為測試 real-time RT-PCR 檢測 CCYV 的靈敏度，以 real-time RT-PCR 方法定量 CCYV 的病毒量，將利用轉殖 CCYV 質體經由胞外

轉錄技術製備 CCYV CP RNA 片段以 10 倍序列稀釋，由相當於 9.8×10^{10} CCYV copy 數稀釋至 9.8×10^{-1} CCYV copy 數和 NTC 共 10 組，以 RT-PCR 方法檢測靈敏度。結果顯示，靈敏度可至 9.8×10^3 copy 數 (圖 2A)。相同樣品以 real-time RT-PCR 方法檢測，靈敏度可至 $9.8 \times$

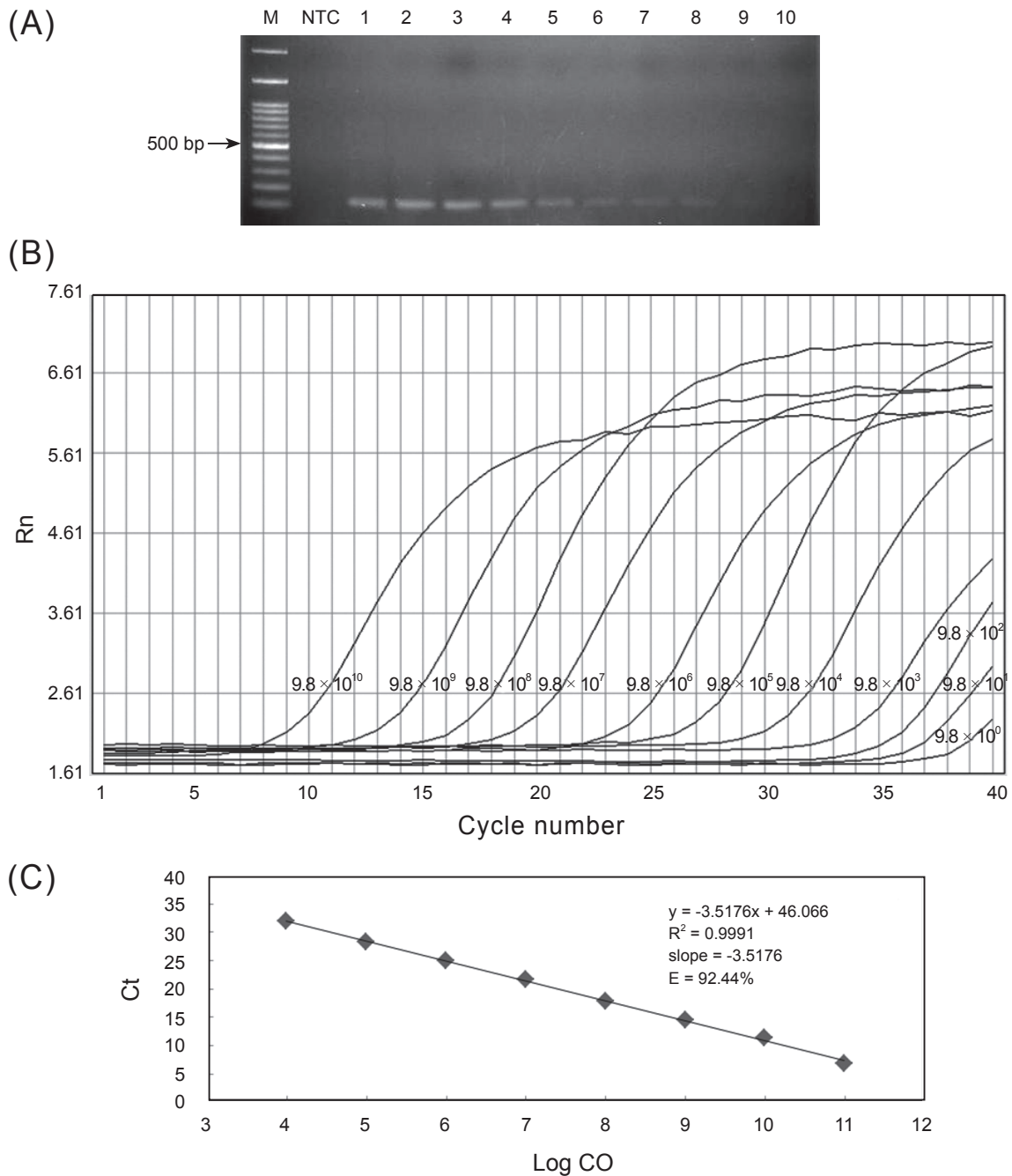


圖 2. 利用 RT-PCR (A) 和 real-time RT-PCR (B) 方法檢測 CCYV 經由胞外轉錄技術製備 CCYV CP RNA 片段的靈敏度試驗。(A) RT-PCR 跑膠的試驗結果，行 NTC：無核酸模板對照組；行 1-10： 9.8×10^{10} 至 9.8×10^1 copy no.；行 M：100 bp ladder。標準曲線 (B)-(C)，縱軸：Ct 值，水平軸：CCYV transcript RNA (9.8×10^{10} to 9.8×10^1 copy no.) 序列稀釋 log copy number 值。

Fig. 2. Sensitivity comparisons of real-time RT-PCR and conventional RT-PCR assays for detection of CCYV. (A) Amplification of 10-fold serial dilutions of the CCYV transcript RNA (9.8×10^{10} to 9.8×10^1 copy no) by the RT-PCR and analyzed by gel electrophoresis. Lane NTC: No Template Control; Lane 1-10: Cloned plasmid of CCYV (9.8×10^{10} to 9.8×10^1); M: 100 bp DNA ladder. (B)-(C), Amplification plots obtained with different concentration of RNA transcripts and the standard curve of 10-fold serial dilutions of CCYV RNA.

10^0 Copy 數。經由上述結果，在檢測 CCYV 靈敏度上，real-time RT-PCR 可檢測最低病毒濃度到 9.8×10^0 copy 數，使用 RT-PCR 則可檢測之最低病毒濃度為 9.8×10^3 copy 數，顯示 real-time RT-PCR 方法高於 RT-PCR 約 1,000 倍。將上述 real-time RT-PCR 靈敏度實驗結果繪製成標準曲線圖 (如圖 2B)，縱座標：Ct 值；橫坐標：CCYV-Transcript RNA copy 數的對數值 (log CO)，標準曲線方程式為 $y = -3.5176x + 46.066$ ， $R^2 = 0.9991$ ， $E = 92.44\%$ ，上述試驗結果可應用於定量病毒含量。

田間洋香瓜 CCYV 偵測

本試驗於台灣台中市霧峰區田共採集 18 個洋香瓜葉片及 11 個南瓜葉片，分別以 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 方式檢測。結果顯示，在 RT-PCR 的部分檢測出 CCYV 之洋香瓜田間樣品包括 3、4、7、10、14 和 16 號 (表 2)，檢出率 33% (6/18)，以及南瓜田間樣品 2、6 和 7 號 (表 3)，檢出率 27% (3/11) 檢測出 CCYV。而在 real-time RT-PCR 的部分，檢測出 CCYV 之洋香瓜田間樣品 3、4、7、8、10、11、12、14、15、16 和 17 號 (表 2)，檢出率 61% (11/18) 以及南瓜田間樣品 2、6、7 和 8 號 (表 3)，檢出率 36% (4/11)。其中，部分田間樣品如 M08、M12、M15、M17 及 S08 等以 RT-PCR 測不出 CCYV，但使用 real-time RT-PCR 則可檢測出 CCYV，顯示 real-time RT-PCR 對於 CCYV 的檢出率高於 RT-PCR。

討論

CCYV 為近年來為害瓜類作物的新病毒之一，由於藉由蟲媒傳播的速度甚快 (Huang *et al.* 2010)，已成為台灣瓜類作物栽培區常發生的重要病害之一。目前使用 real-time PCR 方法偵測病毒已被廣泛使用於瓜類病害檢測，如 *Cucurbit yellow stunting disorder virus*、*Cucumber vein yellowing virus* (Gil-Salas *et al.* 2011)、*Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) 及 *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSVDV) (Gil-Salas *et al.* 2007) 等。本試驗在專一性測試，進行一般 RT-PCR 時，只

表 2. 比較 real-time RT-PCR 和 RT-PCR 檢測田間洋香瓜的 CCYV 感染結果。

Table 2. Detection of CCYV infection of melon in the fields by TaqMan real-time RT-PCR and RT-PCR.

Field sample ^z	RT-PCR	TaqMan real-time RT-PCR
M01	- ^y	-
M02	-	-
M03	+	+(223408) ^x
M04	+	+(612209)
M05	-	-
M06	-	-
M07	+	+(5818352)
M08	-	+(4147)
M09	-	-
M10	+	+(27095676)
M11	-	+(1573)
M12	-	+(2031)
M13	-	-
M14	+	+(7033961)
M15	-	+(2657)
M16	+	+(36441)
M17	-	+(8310)
M18	-	-
CCYV	+	+(18655203)
HE	-	-
NTC	-	-

^z HE: healthy melon; NTC: no template control; CCYV: CCYV infected melon.

^y “+” indicates the presence of a clearly visible band on the agarose gel, whereas “-” indicates a negative reaction.

^x The number of CCYV copies was calculated from the equation of standard curve by linear regression analysis plotting the threshold cycle values vs. the logarithm of the actual starting RNA copy number.

對 CCYV (CCYV-1 和 CCYV-2) 產生 117 bp CCYV 產物之正反應，確定此所設計的引子具有專一性。使用 real-time RT-PCR 亦僅對感染 CCYV 之洋香瓜植株有反應，而對健康的洋香瓜、健康的南瓜、CMV 感染洋香瓜植株、CGMMV 感染洋香瓜植株、PRSV-W 感染洋香瓜植株、ZYMV 感染洋香瓜植株則均為負反應。經由上述 2 個試驗結果顯示，所設計的引子以 RT-PCR 及 real-time RT-PCR 方法試驗皆對 CCYV 病毒基因片段具有專一性。

表 3. 比較 real-time RT-PCR 和 RT-PCR 檢測田間南瓜的 CCYV 感染結果。

Table 3. Detection of CCYV infection of squash in the fields by real-time RT-PCR and RT-PCR.

Field sample ^z	RT-PCR ^y	TaqMan real-time RT-PCR
S01	-	-
S02	+	+(2072) ^x
S03	-	-
S04	-	-
S05	-	-
S06	+	+(88756)
S07	+	+(77357)
S08	-	+(1558)
S09	-	-
S10	-	-
S11	-	-
CCYV	+	+(2550351)
HE	-	-
NTC	-	-

^z HE: healthy melon; NTC: no template control; CCYV: CCYV infected squash.

^y RT-PCR results: +, indicates a clearly visible band in gel electrophoresis; -, indicates a negative reaction.

^x The number of CCYV copies was calculated from the equation of standard curve by linear regression analysis plotting the threshold cycle values vs. the logarithm of the actual starting RNA copy number.

Huang *et al.* (2010) 以 CCYV 的 Hsp70h 基因設計引子對，並藉由 RT-PCR 方式首次在台灣檢測出 CCYV 病毒。也有學者以免疫偵測方式檢測 CCYV，並探討其檢測靈敏度和專一性 (Kubota *et al.* 2011)，其中在偵測 CCYV CP 蛋白的西方墨點法中具有專一性，而在 DAS-ELISA 中，檢測 CCYV CP 蛋白的靈敏度可至 2 ng mL⁻¹；Lin *et al.* (2012) 以 CP 基因為設計區段，設計出具有可偵測至 10⁻⁴ 稀釋濃度的 RT-PCR 引子對。由前人的研究結果顯示，利用血清學所發展之 ELISA 法的靈敏度仍較 RT-PCR 法來的低，因此有發展 RT-PCR 之需求。在定量病毒試驗，Abrahamian *et al.* (2013) 發展以 hsp70h 基因序列同時檢測 CCYV 及 CYSDV 的方法，顯示檢測的靈敏度可達到 100 fg。本研究利用 CCYV transcript RNA 進行 real-time PCR 靈敏度試驗，結果顯示檢測靈敏度可至 10⁻⁸ ng (9.8 × 10⁰ copy

number)，並建立 CCYV 病毒標準曲線，由試驗顯示靈敏度較 Abrahamian 高。此外，本研究另以抽取感染 CCYV 洋香瓜的全 RNA 試驗，以 10 倍序列稀釋方式，由 10 ng μL⁻¹ 稀釋至 10⁻⁵ ng μL⁻¹ 進行試驗，以 RT-PCR 方法檢測靈敏度，結果顯示靈敏度可至 10⁻² ng。相同樣品以 real-time RT-PCR 方法檢測，顯示靈敏度可至 10⁻⁴ ng (結果未列出)。經由上述結果，在 CCYV 檢測靈敏度上，real-time RT-PCR 方法比 RT-PCR 靈敏 100 倍以上。以 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 方式檢測 CCYV，在 RT-PCR 的部分，洋香瓜田間樣品檢出率 33%、南瓜田間樣品檢出率 27%。而在 real-time RT-PCR 的部分，洋香瓜田間樣品檢出率 61%，以及南瓜田間樣品檢出率 36%。經由上述的試驗觀察到設計的引子和探針，不論是 RT-PCR 或是 real-time RT-PCR 可以應用於田間樣品檢測。此外，部分 RT-PCR 測不出 CCYV 的田間樣品，經由 real-time RT-PCR 反應可檢測的到 CCYV，顯示 real-time RT-PCR 對於 CCYV 的檢出率高於 RT-PCR。由結果推測，real-time PCR 法在低濃度之 CCYV 感染植株中，仍可檢測出此病毒之優點。利用 real-time PCR 法，將有助於做為早期田間病害診斷之依據。

引用文獻

- Abrahamian, P. E., R. Seblani, H. Sobh, and Y. Abou-Jawdah. 2013. Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 193:320–326.
- Dietzgen, R. G. and J. E. Thomas. 1991. Properties of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Hawaii, Indonesia and Tonga. *Aust. Plant Pathol.* 20:161–165.
- Gil-Salas, F. M., J. Morris, A. Colyer, G. Budge, N. Boonham, I. M. Cuadrado, and D. Janssen. 2007. Development of real-time RT-PCR assays for the detection of *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) and *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) in the whitefly vector *Bemisia tabaci*. *J. Virol. Methods* 146:45–51.
- Gil-Salas, F. M., J. Peters, N. Boonham, I. M. Cuadrado, and D. Janssen. 2011. Yellowing disease in zucchini squash produced by mixed infections of *Cucurbit*

- yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus*. *Phytopathology* 101:1365–1372.
- Gu, Q. S., Y. H. Liu, Y. H. Wang, W. G. Huangfu, H. F. Gu, L. Xu, F. M. Song, and J. K. Brown. 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in China. *Plant Dis.* 95:73.
- Gyoutoku, Y., S. Okazaki, A. Furuta, T. Etoh, M. Mizobe, K. Kuno, S. Hayashida, and M. Okuda. 2009. Chlorotic yellows disease of melon caused by *Cucurbit chlorotic yellows virus* a new crinivirus. *Jpn. Phytopathol.* 75:109–111.
- Hamed, K., W. Menzel, G. Dafalla, A. M. A. Gadelseed, and S. Winter. 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting muskmelon and cucumber in Sudan. *Plant Dis.* 95:1321.
- Huang, L. H., H. H. Tseng, J. T. Li, and T. C. Chen. 2010. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucurbits in Taiwan. *Plant Dis.* 94:1168.
- Kubota, K., T. Usugi, and S. Tsuda. 2011. Production of antiserum and immunodetection of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a novel whitefly-transmitted crinivirus. *J. Gen. Plant Pathol.* 77:116–120.
- Lin, Y. T., J. Y. Liao, C. H. Tsai, and T. C. Deng. 2012. Complete nucleotide sequence of RNA2 of *Cucurbit chlorotic yellows virus* isolated from melons in Taiwan and its comparisons with currently existing isolates. *J. Taiwan Agric. Res.* 61:132–143. (in Chinese with English abstract)
- Okuda, M., S. Okazaki, S. Yamasaki, S. Okuda, and M. Sugiyama. 2010. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus Crinivirus. *Phytopathology* 100:560–566.
- Ueda, H., Y. Yamaguchi, and H. Sano. 2006. Direct interaction between the *Tobacco mosaic virus* helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 61:31–45.
- Wisler, G. C., J. E. Duffus, H. Y. Liu, and R. H. Li. 1998a. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted Closteroviruses. *Plant Dis.* 82:270–280.
- Wisler, G. C., R. H. Li, H. Y. Liu, D. S. Lowry, and J. E. Duffus. 1998b. *Tomato chlorosis virus*: A new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88:402–409.
- Zeng, R., F. M. Dai, W. J. Chen, and J. P. Lu. 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting melon in China. *Plant Dis.* 95:354.

Evaluation of a TaqMan One-Step Real-Time RT-PCR Method for the Detection of CCYV

Cheng-Ping Kuan^{1,*}, Yu-Chang Lin², Ching-Shan Tseng¹, Ying-Huey Cheng³, and Ting-Ching Deng⁴

Abstract

Kuan, C. P., Y. C. Lin, C. S. Tseng, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2015. Evaluation of a TaqMan one-step real-time RT-PCR method for the detection of CCYV. *J. Taiwan Agric. Res.* 64(3):204–212.

In this study, a diagnostic assay for *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) using TaqMan-based real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was developed. Specific primers were designed by targeting the coat protein gene of CCYV. The sensitivity of qRT-PCR for the detection of CCYV when compared to that of RT-PCR assay was approximately 100–1,000 times higher. The assay is highly specific for CCYV only, no cross-reaction was observed on cucurbits infected with other cucurbit viruses using this assay. The technique is sensitive and accurate, and allows rapid detection and quantitation of CCYV in both field and experimental material used for the surveillance and diagnosis of CCYV.

Key words: *Cucurbit chlorotic yellows virus*, Detection, Real-time RT-PCR.

Received: November 18, 2014; Accepted: February 11, 2015.

* Corresponding author, e-mail: pcr123@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

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

⁴ Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.