

甘藷羽狀斑駁病毒反轉錄恆溫環狀擴增檢測技術 (RT-LAMP) 之建立與應用

林靜宜^{1*} 倪蕙芳² 林慧如³

摘要

林靜宜、倪蕙芳、林慧如。2024。甘藷羽狀斑駁病毒反轉錄恆溫環狀擴增檢測技術 (RT-LAMP) 之建立與應用。台灣農業研究 73(2):113–122。

病毒病害為限制甘藷生產的重要因子，其中由馬鈴薯 Y 病毒屬 (*Potyvirus*) 中之甘藷羽狀斑駁病毒 (sweet potato feathery mottle virus; SPFMV) 引起之病害，為全球甘藷栽培區廣泛發生之病毒病害。甘藷健康種苗的生產與早期的病毒診斷鑑定皆需仰賴快速可靠的病毒檢測技術，亦是有效防治病毒病害的重要關鍵。本研究建立單步驟反轉錄恆溫環狀擴增 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; RT-LAMP) 檢測技術，藉以檢測 SPFMV，並利用比色法，藉 hydroxy naphthol blue 作為指示染劑，以利肉眼辨別反應之結果。以此技術實際檢測罹病甘藷植物總量 RNA，最佳反應條件為 63°C、45–60 min；可檢測的最低 RNA 濃度為 $237.9 \times 10^{-5} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ，相較於反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 可檢測的最低 RNA 濃度為 $237.9 \times 10^{-3} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ，顯示 RT-LAMP 之檢測靈敏度較 RT-PCR 高 100 倍。此外，該 RT-LAMP 技術亦成功應用於田間甘藷之 SPFMV 檢測，顯示 RT-LAMP 檢測技術是具有快速、專一且靈敏之 SPFMV 檢測方法，未來可優化目前種苗檢定技術與提供給甘藷業者使用。

關鍵詞：甘藷羽狀斑駁病毒、反轉錄恆溫環狀擴增檢測技術、甘藷。

前言

甘藷 (學名: *Ipomoea batatas*, 英名: Sweet potato) 為旋花科 (Convolvulaceae)，甘藷屬 (*Ipomoea*) 作物，原產於熱帶美洲墨西哥，隨後傳至熱帶亞洲與非洲，目前為全球五大根莖類作物之一 (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2022)。臺灣現行甘藷生產主要提供鮮食，部分用途為食品加工與工業原料。根據農業部 2022 年之統計年報 (<https://agrstat.moa.gov.tw/sdweb/public/official/OfficialInformation.aspx>) 顯示，臺灣甘藷總裁培面積為 9,154 ha，約 60% 產區集中在雲林縣與彰化縣，分別為 4,137 ha 與 1,467

ha，栽培品種以「台農 57 號」與「台農 66 號」最為常見。

病毒病害為甘藷生產主要的限制因子，由於甘藷利用塊根與莖蔓進行無性繁殖，一旦植株受到病毒感染，將隨後代種苗蔓延而導致產量受到嚴重影響。目前已知可感染甘藷的病毒種類已超過 30 種 (Clark *et al.* 2012)，臺灣文獻記載之甘藷病毒種類則有甘藷捲葉病毒 (sweet potato leaf curl virus; SPLCV) (Chung *et al.* 1985)、甘藷羽狀斑駁病毒 (sweet potato feathery mottle virus; SPFMV) (Liao *et al.* 1979)、甘藷潛伏病毒 (sweet potato latent virus; SPLV) (Liao *et al.* 1979)、甘藷病毒 2 (sweet potato virus 2; SPV2)，又稱甘藷病毒 Y

投稿日期：2023 年 11 月 27 日；接受日期：2024 年 1 月 22 日。

* 通訊作者：eris2024@tari.gov.tw

¹ 農業部農業試驗所植物病理組助理研究員。臺灣 臺中市。

² 農業部農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。臺灣 嘉義市。

³ 農業部農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系計畫助理。臺灣 嘉義市。

(sweet potato virus Y; SPVY) (Wang *et al.* 2014)、甘藷 G 病毒 (sweet potato virus G; SPVG) (Wang *et al.* 2013)、甘藷褪綠矮化病毒 (sweet potato chlorotic stunt virus; SPCSV) (Cheng *et al.* 2020) 及甘藷褪綠斑點病毒 (sweet potato chlorotic fleck virus; SPCFV) (Chiu 2020)。其中分類上為 *Potyvirus* 屬之 SPFMV 廣泛地發生在世界之甘藷產區，為常見的甘藷病毒 (Ateka *et al.* 2004)，此病毒單獨感染甘藷時病徵輕微，常見罹病植株之葉脈呈現羽狀黃化或是葉片出現輕微嵌紋病徵；然而，於田間常與其他病毒如 SPCSV 與 SPLCV 等複合感染植株，則會造成葉片畸形、加重植株黃化嵌紋及矮化的病徵，對甘藷生長造成明顯危害，造成之產量損失可達 44–95% (Domola *et al.* 2008; Adikini *et al.* 2016; Wanjala *et al.* 2020)。

甘藷病毒目前尚無防治藥劑，因此以健康種苗作為栽種來源，於甘藷生產上扮演關鍵的角色，能有效降低病毒發生率、維持甘藷產量及品質。為生產健康種苗，須於種苗生產各階段進行病毒檢測，確定無病毒後，才能進入大量繁殖的階段。因此，病毒檢測技術為發展健康種苗產業的重要關鍵。現今甘藷病毒病主要常見之檢測技術為血清檢測法之酵素連結抗體法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 與分子檢測法中的聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 及反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription PCR; RT-PCR) 等 (Opiyo *et al.* 2010; Li *et al.* 2012; Boonham *et al.* 2014)。然而，血清學檢測需要專一性之抗血清，製作過程繁雜、成本高，目前一些重要的甘藷病毒仍缺乏抗血清，如 SPLCV 等 (Wanjala *et al.* 2021)；此外，甘藷組織中含有抑制物質，可影響血清學檢測之正確性，且血清學檢測適用於病毒力價 (titer) 高之樣品，而甘藷罹病株內之病毒力價低，不易檢出病毒 (Kreuze & Fuentes 2008)。現有之 PCR 與 RT-PCR 等分子檢測法，雖具有專一性與靈敏性，但需要特定的實驗室設備儀器與專業的實驗人員才能完成。本研究為優化現行檢測效率，以恆溫環狀擴增法 (loop-mediated

isothermal amplification; LAMP) (Notomi *et al.* 2000) 為基礎，發展可在恆溫下反應、操作簡便且快速之單步驟反轉錄恆溫環狀擴增 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; RT-LAMP) 檢測 SPFMV，以期能應用於甘藷健康種苗生產、田間病毒診斷及鑑定等工作。

材料與方法

供試病毒來源

2018–2019 年自嘉義、雲林及彰化之甘藷田區採集疑似感染病毒之植株，經 RT-PCR 檢測，並將 RT-PCR 產物核酸定序確認為 SPFMV 感染後，利用扦插方式繁殖罹病株，作為病毒來源。

甘藷總量 RNA 之萃取

植物組織利用 Monarch[®] Total RNA Mini-prep 純化套組 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) 萃取總量 RNA，依據純化套組所附之操作步驟進行。取 0.1 g 植物組織，於研鉢中加入液態氮急速冷凍並研磨成粉狀。將均質之植物組織粉末與 800 μ L RNA protection reagent 於 1.5 mL 微量離心管中均勻混合，離心 2 min (1,600 \times g)，吸取上清液至新的微量離心管中，再加入等體積之 RNA lysis buffer 均勻混合後，吸取 800 μ L 混合液至過濾管 (column tube)，離心 30 s (1,600 \times g)，收集濾液至新的微量離心管。將濾液加入等體積 95% 酒精，混合均勻後，吸取混合液至純化過濾管，離心 30 s (1,600 \times g)，移除濾液後加入 500 μ L RNA priming buffer 至純化過濾管，離心 30 s (1,600 \times g) 後移除濾液。加入 500 μ L RNA wash buffer 至純化過濾管，離心 30 s (1,600 \times g) 後移除濾液，並重複此步驟 1 次。最後加入 100 μ L TE buffer，離心 30 s，濾出純化 RNA。純化之 RNA 存放於 -20 $^{\circ}$ C 條件下，供之後試驗使用。

引子設計

自 GenBank 資料庫中收集 SPFMV 臺灣病

毒株與其他地區病毒株之鞘蛋白 (coat protein; CP) 序列，經比對分析後，選擇 CP 序列的高保留區進行引子設計。藉由 PrimerExplorer V5 軟體 (<http://primerexplorer.jp/e>) 設計引子 (表 1)，核酸引子則委託源資生物科技公司 (臺灣臺北市) 進行合成。

反轉錄恆溫環狀擴增法

利用 Loopamp RNA amplification kit (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 作為反應試劑。反應總體積為 25 μL ，含有 2 μL RNA 模板，12.5 μL 2 \times reaction mix，1 μL 酵素混合液 (*Bst* DNA polymerase 與 AMV reverse transcriptase)，40 pmol 引子 SPFMV-FIP 與 SPFMV-BIP，5 pmol 引子 SPFMV-F3 與 SPFMV-B3，反應條件為 63 $^{\circ}\text{C}$ ，30–60 min；85 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min。反應結果以肉眼觀察是否產生白色混濁物並加入 1 μL 染劑 hydroxy naphthol blue (HNB) (3 mM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 觀察呈色變化，必要時取 10 μL RT-LAMP 產物以 1.5% 瓊脂凝膠電泳分析結果。

反轉錄聚合酵素連鎖反應

以供試植株之總量 RNA 作為模板，根據上述設計的引子 (SPFMV-F3/SPFMV-B3) 進行單步驟 RT-PCR (one-step RT-PCR) (SensoQuest LabCycler 011-101, SensoQuest, Göttingen, Germany)，利用 Super 2 RT-PCR Kit (Protech, Taipei, Taiwan) 作為反應試劑，反應總體積 20 μL ，含有 2 μL RNA 模板，0.5 μL 10 mM 引子與 10 μL 2 \times reaction mix。反應條件為 42 $^{\circ}\text{C}$ 反應 30 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 反應 2 min，重複 35 個循環：93 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 及 72 $^{\circ}\text{C}$

2 min，最終反應於 72 $^{\circ}\text{C}$ 持續 5 min。取 10 μL RT-PCR 產物以 1.5% 瓊脂凝膠電泳分析結果。

專一性試驗

為分析本研究設計之 RT-LAMP 引子組偵測 SPFMV 之專一性，分別自健康甘藷植株與感染 SPLV、SPCSV 及 SPFMV 之罹病甘藷植株，以上述方法萃取其總量 RNA，作為測試模板來源。取 2 μL RNA 進行 RT-LAMP，反應結果以加入染劑 (3 mM HNB) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 觀察呈色變化，並以 1.5% 瓊脂凝膠電泳分析確認結果。

比較 RT-PCR 與 RT-LAMP 偵測 SPFMV 之靈敏度試驗

為分析 RT-LAMP 檢測技術與 RT-PCR 技術之靈敏度差異，將萃取罹病甘藷植株之總量 RNA 濃度自起始經 10 倍系列稀釋後，分別依上述方法進行 RT-LAMP 與單步驟 RT-PCR 試驗。RT-LAMP 之反應結果以加入染劑 (3 mM HNB) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 觀察呈色變化並以 1.5% 瓊脂凝膠電泳分析確認結果；RT-PCR 產物以 1.5% 瓊脂凝膠電泳分析結果。

田間罹病株之病毒檢測

自田間採集具有疑似病毒病徵 (黃化與嵌紋等) 之甘藷葉片，依上述方法取約 0.1 g 葉片組織萃其總量 RNA，將純化之 RNA 分別利用上述 RT-LAMP 與 RT-PCR 方法進行 SPFMV 之檢測與分析。

表 1. 本研究中使用之引子。

Table 1. The primers used in this study.

| Primer name | Sequence 5' to 3' | Target region |
|-------------|-------------------------------------|---------------|
| SPFMV-F3 | CAACGTAATTTGACTGATATG | Coat protein |
| SPFMV-B3 | GTCGTGTGCCTCTCCGATATC | |
| SPFMV-FIP | TCTTTWGRCGTGYAGGGCGGATATGCATTTGAT | |
| SPFMV-BIP | GCACTTAAGAATGCGTCTTTCGTGGAGACGTTTCC | |

結果

RT-LAMP 偵測 SPFMV 之反應條件試驗

為建立穩定與有效之 RT-LAMP 反應條件，本研究利用自罹病植株萃取之 RNA 作為模板，進行最佳反應溫度與時間之試驗。有效反應溫度試驗中，結果顯示所設計之 SPFMV 引子組於 60–65°C 區間反應後經電泳分析都能觀察到產物之生成，皆為正反應，其中以 63°C 時所增幅之產物條帶最為顯著 (圖 1A)。因此，選擇於 63°C 時，利用 RT-LAMP 分別進行 30、45 及 60 min 之有效反應時間試驗，電泳分析結果發現反應時間為 45 與 60 min 皆能增幅出產物，但時間長度為 30 min 時，則未觀察到產物生成 (圖 1B)。綜上所述，SPFMV 最佳反應條件為 63°C、45–60 min 後經 85°C、5 min 以停止反應。RT-LAMP 反應結果為正反應時，會生成白色混濁物，可藉由肉眼辨別 (圖 1C)。此外，亦可利用染劑呈色經由肉眼直接判別。本研究利用 HNB 作為指示染劑，建立

可視化技術，染劑加入反應液後，正反應時呈現藍色，負反應時則為紫色 (圖 1C)。

引子專一性試驗

本試驗中係對 SPFMV 鞘蛋白序列之高保留區設計引子組，為確認引子組對 SPFMV 之專一性，於 63°C 條件下進行 RT-LAMP 反應 60 min，結果顯示僅 SPFMV 之罹病植株 RNA 作為模板時出現正反應，可觀察到指示染劑呈現藍色；其他罹病植株 RNA 如 SPLV、SPCSV、未罹病植株 RNA 及無核酸模板對照組皆為負反應，於加入指示染劑時，呈現紫色 (圖 2)。

RT-PCR 與 RT-LAMP 之靈敏度比較

為瞭解 RT-LAMP 偵測 SPFMV 之靈敏度，同時與 RT-PCR 技術比較兩者間的靈敏度差異，以萃取罹病植株 RNA 作為試驗用模板，RNA 以分光光度計測定其濃度為 237.9 ng μL^{-1} 。將 RNA 之起始濃度經系列 10 倍稀釋後分別進

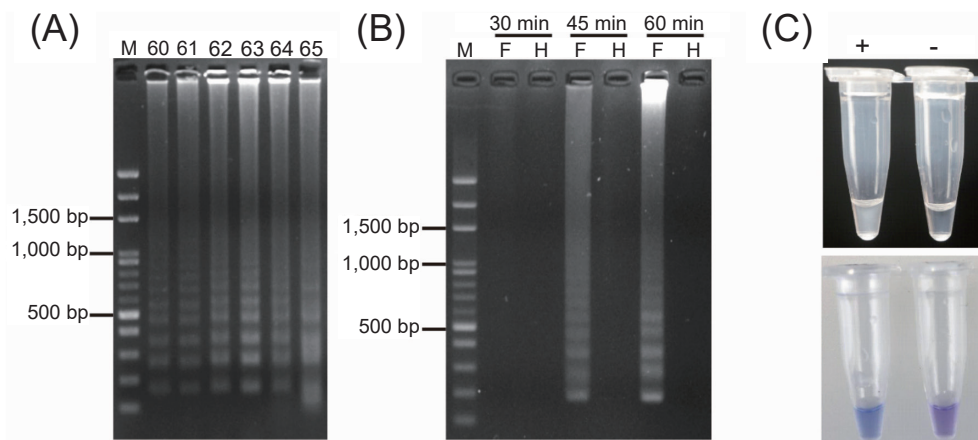


圖 1. 以 RT-LAMP 偵測 SPFMV 之最適條件試驗。(A) 於 60、61、62、63、64 及 65°C 測試反應之最適溫度。(B) 於 30、45 及 60 min 測試最適反應時間。F：感染 SPFMV 甘藷葉 RNA；H：健康甘藷葉組織 RNA；M：100 bp DNA ladder。(C) 利用比色法分析 RT-LAMP 產物。上：未加入指示染劑之反應結果；下：加入指示染劑 (HNB) 之反應結果。+：正反應；-：負反應。

Fig. 1. Optimization assays of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detecting sweet potato feathery mottle virus (SPFMV). (A) The optimal temperature tests at 60, 61, 62, 63, 64 and 65°C. (B) The optimal reaction times for amplification at 30, 45 and 60 min. F: RNA from SPFMV infected sweet potato leaves; H: RNA from healthy sweet potato leaves; M: 100 base pairs (bp) DNA ladder. (C) The colorimetric RT-LAMP assay. Up: the naked-eye visual RT-LAMP assay without indicator dye; down: the naked-eye visual RT-LAMP assay with indicator dye (hydroxy naphthol blue; HNB). +: positive reaction; -: negative reaction.

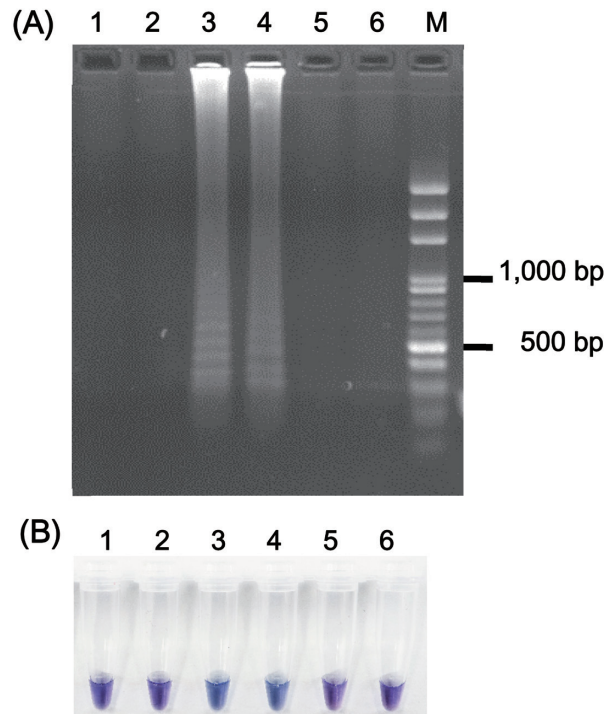


圖 2. 利用 RT-LAMP 偵測 SPFMV 之專一性試驗。(A) 以 1.5% 瓊脂凝膠電泳分析結果；(B) 加入指示染劑 (HNB) 之呈色結果。1：感染 sweet potato latent virus (SPLV) 之病株 RNA；2：感染 sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) 病株 RNA；3-4 感染 SPFMV 病株 RNA；5：健康甘藷植株 RNA；6：無核酸模板對照組；M：100 bp DNA ladder。

Fig. 2. Specificity of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detecting the RNA of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV). The amplified products were detected by (A) 1.5% agarose-gel electrophoresis and (B) indicator dye (hydroxy naphthol blue; HNB). No.1: RNA from sweet potato latent virus (SPLV) infected plants; No. 2: RNA from sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) infected plants; No. 3-4: RNA from SPFMV infected plants; No. 5: RNA from healthy sweet potato plants; No. 6: non-templet control; and M: 100 base pairs (bp) DNA ladder.

行 RT-LAMP 與 RT-PCR。反應後之電泳分析結果顯示，RT-LAMP 的偵測最低濃度為 $237.9 \times 10^{-5} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (圖 3A)，以指示染劑進行呈色時，亦可觀察到染劑轉為藍色時之最低濃度為 $237.9 \times 10^{-5} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (圖 3B)。RT-PCR 反應之預期條帶大小為 194 bp (base pair)，經電泳分析結果顯示可偵測最低濃度為 $237.9 \times 10^{-3} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (圖 3C)。

田間植株之病毒檢測

利用 RT-LAMP 與 RT-PCR 法檢測田間疑似病毒感染之甘藷樣品，共採集 14 株田間甘藷葉片，萃取總量 RNA 後進行檢測，結果顯

示，RT-LAMP 測得 9 株感染 SPFMV，其檢出率為 64.3%；使用 RT-PCR 則測得 7 株具有 SPFMV，檢出率為 50% (表 2)，顯示 RT-LAMP 與傳統 RT-PCR 法皆可應用於檢測田間受 SPFMV 感染之甘藷植株，但其中以 RT-LAMP 較為靈敏。

討論

病毒為甘藷生產過程中影響產量與品質的重要病原之一，嚴重時產量損失可達 44–95% (Domola *et al.* 2008; Adikini *et al.* 2016; Wanjala *et al.* 2020)。目前防治管理方法主要使用

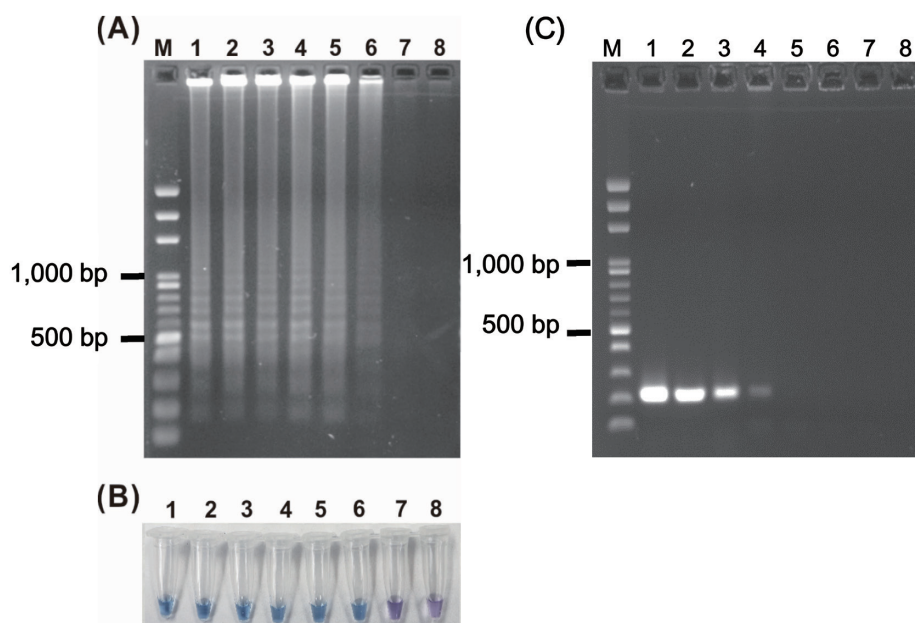


圖 3. RT-LAMP 與 RT-PCR 檢測 SPFMV 之靈敏度試驗。萃取 SPFMV 罹病株之 RNA，起始濃度自 $237.9 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 以 10 倍系列稀釋方式稀釋至 $237.9 \times 10^{-6} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (1-7) 分別利用 (A) 1.5% 瓊脂凝膠電泳分析法與 (B) 指示染劑 (HNB) 呈色法測試 RT-LAMP 與 (C) RT-PCR 可偵測之最低濃度。M：100 bp DNA ladder；8：無核酸模板對照組。

Fig. 3. Sensitivity of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays. Serial 10-fold dilutions of the RNA of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV)-infected plants ranging from 237.9 to $237.9 \times 10^{-6} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (No. 1–7) were used to determine the minimum concentration that the (A and B) RT-LAMP and (C) RT-PCR was able to identify. (A) RT-LAMP identified by 1.5% agarose-gel electrophoresis and (B) RT-LAMP identified with indicator dye. M: 100 base pairs (bp) DNA ladder; and No. 8: non-template control.

健康無病毒之甘藷種苗與避免病毒媒介昆蟲大量滋生，得以減少病害蔓延。鑑於 SPFMV 為臺灣與其他國家甘藷生產區廣泛發生與常見之甘藷病毒，引起的病徵常隨甘藷品種、病毒株及環境而改變，且單獨感染甘藷時病徵輕微，不易直接診斷鑑定 (Untiveros *et al.* 2008)。因此，為早期預警病毒之發生，防堵病毒擴散並健全甘藷健康種苗生產體系，建立病毒快速篩檢技術甚為重要。本研究針對 SPFMV 開發之 RT-LAMP 檢測技術，具有靈敏度高於 RT-PCR、並能藉由肉眼直接判別結果的特點，可提供更為省時與簡便的檢測方法，作為協助甘藷健康種苗生產、田間病毒診斷及鑑定等工作之利器。

血清學法為常用之病毒檢測技術，然而甘藷富含澱粉與酚化物等抑制物質，往往使檢

測精確度受到影響 (Kreuze & Fuentes 2008; Wanjala *et al.* 2021)，現今多應用核酸分子技術進行病毒檢測與鑑定。目前 SPFMV 檢測技術除了利用 RT-PCR 之外，近期 LAMP 技術亦被應用於此病毒檢測 (Jiang *et al.* 2018; Wanjala *et al.* 2021)。Jiang *et al.* (2018) 開發之 RT-LAMP 法，選擇 SPFMV 之 CP 基因，設計 2 個引子組，可專一性地偵測 SPFMV，此法反應時間需 70 min，靈敏度稀釋終點為 10^4 稀釋倍率，且靈敏度較 RT-PCR 檢測方法高 10 倍。本研究設計偵測 SPFMV 之 2 個引子組，以臺灣病毒株之序列為主，檢測的目標基因同樣為 CP 基因，但本研究建立之 RT-LAMP 方法，除可正確地檢測感染之 SPFMV，反應時間縮短為 45–60 min，可提供更快速的有效反應時間。靈敏度測試方面，電泳分析結果顯示

表 2. 利用反轉錄恆溫環狀擴增法 (RT-LAMP) 與反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 進行田間疑似感染 sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) 之甘藷植株檢測結果。

Table 2. Detection of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for field sweet potato plants.

| Field sample ^z | RT-LAMP ^y | RT-PCR ^x |
|---------------------------|----------------------|---------------------|
| A1 | - | - |
| A2 | + | + |
| A3 | + | + |
| G1 | + | + |
| G2 | - | - |
| G3 | + | + |
| G4 | + | + |
| L1 | + | + |
| L2 | + | - |
| L3 | + | - |
| L4 | - | - |
| L5 | - | - |
| L6 | - | - |
| L7 | + | + |
| SPFMV | + | + |
| H | - | - |

^z SPFMV: SPFMV infected sweet potato as positive control; H: healthy sweet potato as negative control.

^y RT-LAMP results: + indicates a color change in the samples from purple to blue suggesting SPFMV infections; - indicates no color change in the samples suggesting negative reactions.

^x RT-PCR results: + indicates a clear visible band in 1.5% agarose-gel electrophoresis; - indicates a negative reaction.

本研究之 RT-LAMP 法的稀釋終點靈敏度可達 10^5 稀釋倍率，相較 RT-PCR 法可提高靈敏度 100 倍。本研究開發之方法靈敏度較高，推測可能與使用之核酸萃取試劑組不同，使甘藷核酸樣本中含有較少的多酚等物質，減少反應中的干擾作用，有助提升靈敏度。此外，LAMP 生成之產物可利用多種方法檢視，如傳統之電泳分析、比色法 (colorimetric) (以螢光染劑或顏色指示劑加以顯色) 以及經由反應過程中產生不溶於水的焦磷酸鎂 (magnesium pyrophosphate) 白色沉澱物造成反應液濁度 (turbidity) 上升等。雖然 Wanjala *et al.* (2021) 開發的即時螢光定量 LAMP 法，選擇 SPFMV 之 CP 基

因設計 3 個引子組，可於甘藷組織粗萃液樣本中檢測 SPFMV，依病毒量的高低不同，其反應時間約 5–30 min，但需購置相關螢光反應器材，本研究則利用比色法，藉 HNB 作為指示染劑辨別結果，此法的稀釋終點靈敏度與電泳分析法相當，顯示以 HNB 檢視反應結果，可提供快速與簡便的辨別方法，不須經儀器觀測反應結果，可降低檢測成本。

田間病毒檢測試驗顯示疑似病毒感染之甘藷植株中，以 RT-LAMP 檢測 SPFMV，其檢出率為 64.3%，而 RT-PCR 之檢出率為 50%，顯示本研究所建立之 RT-LAMP 可有效應用於檢測田間受 SPFMV 感染之甘藷植株，且與 RT-PCR 相較，本技術具有快速與高靈敏性。此外，亦可從檢出率發現臺灣田間甘藷栽培與其他甘藷栽培區如南韓、馬拉威等地相似，SPFMV 為普遍感染田間甘藷之病毒 (Ateka *et al.* 2004; Kwak *et al.* 2014; Mbewe *et al.* 2021)。於檢測植株中，部分樣本具有疑似病毒感染病徵，但仍未檢出 SPFMV，可能為植株受到其他甘藷病毒感染，如 SPCSV 亦可引起葉片黃化。此外，植物生理性障礙也可能引起與病毒黃化病徵相似之症狀，如甘藷缺鋅與缺鎂可導致葉脈間黃化、缺硫也會造成葉片黃化或葉脈透化的現象，其他如土壤水分過多與過度施肥也可能為植株出現黃化現象的原因之一 (O'Sullivan *et al.* 1997)，此部分需做進一步分析才能釐清。

本研究針對 SPFMV 建立之 RT-LAMP 檢測技術，兼具快速、專一性高及靈敏度優於 RT-PCR 等優點，並搭配可經肉眼直接判別結果之可視化技術，不需使用複雜的專業儀器設備即可操作，可提供檢測單位更為省時與簡便的 SPFMV 檢測方法。此外，為使健康種苗檢定工作更加健全，促使種苗產業升級，發展現場即時檢測 (on-site detection) 技術之需求大為提升。因此，本研究之 RT-LAMP 檢測技術，未來如配合植物核酸萃取技術進行簡化，或評估利用植物組織粗汁液作為檢測之反應模板的可行性，亦可開發 RT-LAMP 乾式檢測試劑套組與手持式的檢測裝置等，使種苗檢定人員可於檢查現場即時告知檢定結果，大幅縮短現行驗證檢定方法之結果等待期，未來也可提供不

具分子生物學背景的種苗業者能輕易自行進行種苗病毒檢測，更能落實早期預警病毒病之發生與提高健康種苗生產率。

誌謝

本研究承農業部農業試驗所嘉義農業試驗分所蔡佳達先生與林江美華小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

- Adikini, S., S. B. Mukasa, R. O. M. Mwangi, and R. W. Gibson. 2016. Effects of Sweet potato feathery mottle virus and Sweet potato chlorotic stunt virus on the yield of sweetpotato in Uganda. *J. Phytopathol.* 164:242–254. doi:10.1111/jph.12451
- Ateka, E. M., R. W. Njeru, A. G. Kibaru, J. W. Kimenju, E. Barg, R. W. Gibson, and H. J. Vetten. 2004. Identification and distribution of viruses infecting sweet potato in Kenya. *Ann. Appl. Biol.* 144:371–379. doi:10.1111/j.1744-7348.2004.tb00353.x
- Boonham, N., J. Kreuze, S. Winter, R. van der Vlugt, J. Bergervoet, J. Tomlinson, and R. Mumford. 2014. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Res.* 186:20–31. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.007
- Cheng, Y. H., Y. C. Wang, L. Y. Wang, L. H. Huang, and T. C. Chen. 2020. First report of Sweet potato chlorotic stunt virus infecting sweetpotato in Taiwan. *Plant Dis.* 104:2535. doi:10.1094/PDIS-01-20-0122-PDN
- Chiu, M. S. 2020. The first record of Sweet potato chlorotic fleck virus in Taiwan and the establishment of its detection system. Master Thesis. Department of Applied Chemistry, Chaoyang University of Technology. Taichung, Taiwan. 25 pp. (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 disease agent in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 27:333–341.
- Clark, C. A., J. A. Davis, J. A. Abad, W. J. Cuellar, S. Fuentes, J. F. Kreuze, ... J. P. T. Valkonen. 2012. Sweet potato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases. *Plant Dis.* 96:168–185. doi:10.1094/PDIS-07-11-0550
- Domola, M. J., G. J. Thompson, T. A. S. Aveling, S. M. Laurie, H. Strydom, and A. A. Van den Berg. 2008. Sweet potato viruses in South Africa and the effect of viral infection on storage root yield. *Afr. Plant Prot.* 14:15–23.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. FAOSTAT: Production: Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (visit on 11/14/2023)
- Jiang, S. S., J. Feng, M. Zhang, S. J. Wang, Z. M. Xin, B. Wu, and X. Q. Xin. 2018. Development of RT-LAMP assay for rapid detection of Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV). *Sci. Agric. Sin.* 51:1294–1302. (in Chinese with English abstract) doi:10.3864/j.issn.0578-1752.2018.07.007
- Kreuze, J. and S. Fuentes. 2008. Sweetpotato viruses. p.659–669. *in: Encyclopedia of Virology*. 3rd ed. (Mahy, B. W. J. and M. H. V. Van Regenmortel, eds.) Academic Press. Amsterdam, The Netherlands. 3192 pp. doi:10.1016/B978-012374410-4.00647-6
- Kwak, H. R., M. K. Kim, J. C. Shin, Y. J. Lee, J. K. Seo, H. U. Lee, ... H. S. Choi. 2014. The current incidence of viral disease in Korean sweet potatoes and development of multiplex RT-PCR assays for simultaneous detection of eight sweet potato viruses. *Plant Pathol. J.* 30:416–424. doi:10.5423/PPJ.OA.04.2014.0029
- Li, F., R. Zuo, J. Abad, D. Xu, G. Bao, and R. Li. 2012. Simultaneous detection and differentiation of four closely related sweet potato potyviruses by a multiplex one-step RT-PCR. *J. Virol. Methods* 186:161–166. doi:10.1016/j.jviromet.2012.07.021
- Liao, C. H., I. C. Chien, M. L. Chung, R. J. Chiu, and Y. H. Han. 1979. A study of sweet potato virus disease in Taiwan I. Sweet potato yellow spot virus disease. *J. Agric. Res. China* 28:127–137. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.197909.0001
- Mbewe, W., A. Mtonga, M. Chiipanthenga, K. Masambaet, G. Chitedze, P. Pamkomera, ... F. Chipungu. 2021. Incidence and distribution of Sweetpotato viruses and their implication on sweetpotato seed system in Malawi. *J. Plant Pathol.* 103:961–968. doi:10.1007/s42161-021-00830-4
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:e63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
- Opiyo, S. A., E. M. Ateka, P. O. Owuor, L. O. A. Manguro, and D. W. Miano. 2010. Development of a multiplex PCR technique for simultaneous detection of Sweet potato feathery mottle virus and Sweet potato chlorotic stunt virus. *J. Plant Pathol.* 92:363–366.
- O'Sullivan, J. N., C. J., Asher, and F. P. C., Blamey. 1997. Nutrient Disorders of Sweet Potato. ACIAR Monograph No. 48. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia. 136 pp.
- Untiveros, M., S. Fuentes, and J. Kreuze. 2008. Molecular

- variability of sweet potato feathery mottle virus and other potyviruses infecting sweet potato in Peru. *Arch. Virol.* 153:473–483. doi:10.1007/s00705-007-0019-0
- Wang, L. Y., Y. H. Cheng, N. Y. Wang, K. C. Chen, and S. D. Yeh. 2013. First report of Sweet potato virus G infecting sweet potato in Taiwan. *Plant Dis.* 97:1260. doi:10.1094/PDIS-01-13-0111-PDN
- Wang, L. Y., S. F. Lo, and Y. C. Lai. 2014. Assessment for the viral resistance of sweet potato varieties to three potyviruses by graft inoculation. *Plant Pathol. Bull.* 23:303–309. doi:10.6649/PPB.201409_23(3_4).0008
- Wanjala, B. W., E. M. Ateka, D. W. Miano, S. Fuentes, A. Perez, J. W. Low, and J. F. Kreuze. 2021. Loop-mediated isothermal amplification assays for on-site detection of the main sweetpotato infecting viruses. *J. Virol. Methods* 298:114301. doi:10.1016/j.jvromet.2021.114301
- Wanjala, B. W., E. M. Ateka, D. W. Miano, J. W. Low, and J. F. Kreuze. 2020. Storage root yield of sweetpotato as influenced by Sweetpotato leaf curl virus and its interaction with Sweetpotato feathery mottle virus and Sweetpotato chlorotic stunt virus in Kenya. *Plant Dis.* 104:1477–1486. doi:10.1094/PDIS-06-19-1196-RE

Establishment and Application of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay (RT-LAMP) for the Detection of Sweet Potato Feathery Mottle Virus in Sweet Potato

Ching-Yi Lin^{1,*}, Hui-Fang Ni², and Hui-Ju Lin³

Abstract

Lin, C. Y., H. F. Ni., and H. J. Lin. 2024. Establishment and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP) for the detection of sweet potato feathery mottle virus in sweet potato. *J. Taiwan Agric. Res.* 73(2):113–122.

Viral diseases are a major constraint to sweet potato production. Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), a member of the genus *Potyvirus*, is the most widespread virus infecting sweet potato plants worldwide. The production of healthy sweet potato seedlings and the diagnosis of plant viruses at early stage rely on rapid and reliable viral detection technology, which is critical for effective viral prevention and control. In this study, a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay was developed for detecting SPFMV. The RT-LAMP assay has been optimized to use hydroxy naphthol blue (HNB) for visual colorimetric distinction of positive and negative samples. Using total plant RNA of sweet potato as the template, the optimal reaction conditions were at 63°C for 45–60 min. The detection limit of the RT-LAMP assay for SPFMV was 237.9×10^{-5} ng μL^{-1} , while that of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was 237.9×10^{-3} ng μL^{-1} , indicating that the RT-LAMP assay developed was 100 times more sensitive than RT-PCR. The RT-LAMP assay was also successfully applied to the detection of SPFMV in field samples. In conclusion, the RT-LAMP assay developed in this study was a rapid, specific and sensitive method for the detection of SPFMV in field samples of sweet potato.

Key words: Sweet potato feathery mottle virus, Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, Sweet potato.

Received: November 27, 2023; Accepted: January 22, 2024.

* Corresponding author, e-mail: eris2024@tari.gov.tw

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

² Associate Research Fellow and Division Director, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Research Assistant, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.