

以即時反轉錄-聚合酶連鎖反應技術鑑別與檢測甜椒之 馬鈴薯 Y 病毒及番椒斑駁病毒

關政平^{1,*} 鄭櫻慧² 蔡佳欣³ 曾清山¹ 楊佐琦⁴

摘要

關政平、鄭櫻慧、蔡佳欣、曾清山、楊佐琦。2022。以即時反轉錄-聚合酶連鎖反應技術鑑別與檢測甜椒之馬鈴薯 Y 病毒及番椒斑駁病毒。台灣農業研究 71(1):11-18。

本研究利用 real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 核酸增幅技術，首次建立可鑑定和區分馬鈴薯 Y 病毒 (potato virus Y) 及番椒斑駁病毒 (pepper mottle virus) 之方法。結果顯示本核酸增幅技術，可同時偵測甜椒罹染馬鈴薯 Y 病毒及番椒斑駁病毒，與其他茄科病毒及健康之植物無反應，對於單一或是複合感染皆可鑑定，由結果顯示此核酸增幅技術具有專一性佳及靈敏度高等優點，且可用於定量病毒在罹病組織內之濃度，將可應用於田間番椒罹染此 2 種病毒之監測。

關鍵詞：馬鈴薯 Y 病毒、番椒斑駁病毒、偵測、Real-time RT-PCR 增幅技術。

前言

馬鈴薯 Y 屬病毒 (*Potyvirus*) 為 Potyviridae 科之絲狀病毒基因體，長度約 737 nm × 11 nm 之單股 RNA 基因體，分子量大小約 10 kb (Shukla *et al.* 1994)。Potyvirus 感染茄科作物，造成世界性病害，包括馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.)、甜椒 (*Capsicum* spp.) 和番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 等作物之損失 (Benner *et al.* 1985)。此屬病毒與馬鈴薯病毒有血清學上之關係 (Purcifull *et al.* 1975)。在台灣，田間感染番椒作物的病毒則有馬鈴薯 Y 病毒 (potato virus Y; PVY) (Lee 1970)、番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus) (Cheng *et al.* 2009)、辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus) 和番椒斑駁病毒 (pepper mottle virus; PepMoV) (Cheng *et al.* 2011, 2013) 等。許多番椒病毒病癥不易區分，在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。在田間，甜椒被 2 種或是 2 種以上病毒的感染相當常見，多重病毒感染率甚至可到 90% (Abdalla *et al.* 1991)。

PepMoV 和 PVY 由蚜蟲以非持久方式傳播而感染茄科作物 (Han *et al.* 2006)；田間常見 PepMoV 感染甜椒造成重大損失 (Kim *et al.* 2009)。而 PVY 被認為是影響全世界經濟最重要的病毒之一 (Scholthof *et al.* 2011; Quenouille *et al.* 2013)，除感染馬鈴薯引起損失外，且威脅番椒和番椒等作物生產 (Scholthof *et al.* 2011; Crosslin 2012; Quenouille *et al.* 2013)。

目前植物病毒常見之檢測方法包括酵素連結抗體免疫標誌法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) (Dietzgen & Thomas 1991; Kubota *et al.* 2011)、反轉錄聚合酶連鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) (Gyoutoku *et al.* 2009) 等，

投稿日期：2021 年 4 月 14 日；接受日期：2021 年 10 月 12 日。

* 通訊作者：pcr123@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

另外即時反轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-PCR) 方法也廣泛用在多種植物病毒檢測 (Mackay 2004)，惟目前尚缺利用 real-time RT-PCR 於甜椒檢測 PVY 及 PepMoV 之方法。本研究主要是利用 real-time RT-PCR 反應，以 PVY 和 PepMoV Nib 基因區域結合的專一性探針，檢測樣品是否帶有 *Potyvirus* 屬病毒，探討此核酸檢測法之檢測專一性與靈敏度，並達到可區分 PepMoV 和 PVY 的鑑別檢測效果，以建立 real-time RT-PCR 對此 2 種病毒之檢測應用效益。

材料與方法

病毒來源

採集自南投投縣之彩色甜椒，葉片呈現嵌紋及植株矮化病徵等疑似病毒感染 (如 PVY 或 PepMoV) 者為試驗材料。取其葉片以 10 倍量 (w/v) 磷酸鉀緩衝液 (0.01 M KHPO_4 , pH 7.0) 研磨後，經汁液接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 進行單斑分離 3 次。取單一分離株接種於煙草 (*Nicotiana benthamiana*) 植物，作為本試驗接種源並將病葉組織置於 50% 甘油於 -20°C 長期保存。

取罹病 *N. benthamiana* 作為接種源依前述方法接種甜椒 (*Capsicum annuum*)，甜椒種植約一個月大，分別接種包括 PVY 和 PepMoV，並種植於溫室進行病徵觀察觀察 6 wk 後採集葉片，經 RT-PCR 及核酸定序方法做確認。其他病毒分離株包括：potato virus X (PVX)、tobacco mosaic virus (TMV)、tomato mosaic virus (ToMV)、cucumber mosaic virus (CMV) 和 pepper mild mottle virus (PMMoV) 等，為本所植物病理組病毒與細菌研究室收集與保存 (Cheng *et al.* 2013)；所有供試病毒經接種於 *N. benthamiana* 後作為接種源供後續試驗用。

植株全 RNA 的抽取純化

取 0.1 g 新鮮甜椒葉片，置於液態氮中研磨，並參照市售試劑組 (Trizol Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 的操作手冊抽取甜椒葉片全 RNA，抽取完成的全 RNA 保存於 -80°C ，待後續試驗使用。

Real-time RT-PCR 引子及探針的設計

Real-time RT-PCR 引子是藉由 Primer Express™ (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA) 軟體所設計，並由基龍米克斯生物科技股份有限公司 (台灣新北市) 所合成。引子 (Potyvirus-Nib-350.1-F/R) 可專一性結合於 Nib 基因序列，產物大小為 350 bp (如表 1)。使用由本試驗所設計 2 組 PVY 及 PepMoV 專一性探針，亦即採用 Zheng *et al.* (2008) 使用的 Potyvirus-Nib-350.1-F/R 通用引子對，並由該引子對之增幅核酸區域分別設計 PVY 序列探針及 PepMoV 序列探針，作為引子和探針的設計區段，real-time RT-PCR 螢光探針序列是藉由 Primer Express™ (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA) 軟體所設計，並由 Biosearch Technologies Inc. (Petaluma, CA, USA) 所合成。此專一性螢光探針 (PVY-Nib-350.1-Probe、PEPMOV-Nib-350-Probe 如表 1 所示) 是一段專一性結合於 Nib 基因序列。專一性探針 5' 和 3' 端分別標定 FAM (6-carboxy fluorescein excitation wavelength = 494 nm) 螢光物質及 BHQ1 (excitation wavelength = 534 nm) 吸收螢光物質。

RT-PCR 和 real-time RT-PCR 方法

所使用的 RT-PCR 分成 RT 及 PCR 二部分：(1) 於 25 μL RT 反應中，首先加入 2 μg 甜椒葉片全 RNA、1 μL oligo-dT 和 random hexamer 後混合，於 70°C 反應 5 min 後放入冰中；之後於原反應管中分別加入 5 μL 之 5 \times first strand buffer (Promega, Madison, WI, USA)、5 μL 10 mM dNTP、1 μL MMLV RT (200 U) (Promega)、1 μL Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (25 U) (Promega)，加無菌水補至 25 μL ，反應時間為 60 min 42°C 。(2) 於 PCR 反應中，分別加入 2.5 μL 之 10 \times buffer (Protech, Taipei, Taiwan)、0.5 μL 之 10 mM dNTP、各 0.5 μL 之 0.1 μM Potyvirus-Nib-350.1-F/R 引子、2 μL 的全 RNA 模板、以 ddH₂O 補至 25 μL 。PCR 反應條件為 $95^\circ\text{C}/5$ min、30 個循環的 $95^\circ\text{C}/30$ s、 $55^\circ\text{C}/30$ s 和 $72^\circ\text{C}/30$ s， $72^\circ\text{C}/5$ min 和 16°C 定溫。

Real-time RT-PCR 所使用的藥劑為 KAPA PROBE FAST qPCR Kit (Kapa Biosystem,

表 1. 本試驗所使用之引子與核酸探針。

Table 1. Nucleotide sequences of primers and TaqMan probes used in this study.

Primer/probe	Sequence (5'-3')	Product (bp)	T _m (°C)	Reference
Primers				
Potyvirus-Nib-350.1 (F)	GTGTGTGTWGATGAYYTCAAYAA	350	45	Zheng <i>et al.</i> (2008)
Potyvirus-Nib-350.1 (R)	TCYACAACGGTRGAAGGTTGMCC	350	60	Zheng <i>et al.</i> (2008)
TaqMan probes				
PVY-Nib-350.1-Probe	Quasar 670-TGGTTGGGATAAATTG CTTCGGCGTC-BHQ-2 ²			This study
PEPMOV-Nib-350-Probe	CAL Fluor Orange 560-CATTCCA ACCGTCCAACAACATTCA-BHQ-1 ³			This study

² GenBank Accession no. AB711155.1 (potato virus Y genomic RNA, nearly complete genome).

³ GenBank Accession no. NC_001517.1 (pepper mottle virus, complete genome).

Wilmington, 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 \times) 10 μL 、0.1 μM Potyvirus-Nib-350.1-F/R 引子各 2 μL 、0.5 μM PVY-Nib-350.1-Probe 探針、0.5 μM PepMoV-Nib-350.1-Probe 探針、ROX Low (50 \times) 0.4 μL 、KAPA RT Mix (50 \times) 0.4 μL 、2 μL 的 cDNA 模板 (等比例混合之 PVY 和 PepMoV cDNA)、以 ddH₂O 補至 20 μL 。反應條件為: 95°C/3 min, 40 個循環的 95°C/15 s、60°C/1 min。Real-time RT-PCR 反應偵測機器為 ABI PRISM[®] 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA)。

RT-PCR 和 real-time RT-PCR 的專一性測定

為測定所設計的引子和探針序列是否對 PepMoV 和 PVY 序列具專一性, 以健康甜椒植株葉片和感染不同病毒之煙草葉片組織包括 TMV、ToMV、PMMoV、CMV 和 PVX, 抽取煙草全 RNA 進行 RT-PCR 及 real-time RT-PCR 反應, 其反應物及條件如前述。

檢測 PVY 和 PepMoV 的靈敏度試驗

為測定所設計的探針應用於本研究之 real-time PCR 對檢測 PVY 和 PepMoV 病毒的靈敏度, 本研究使用罹染病毒之植物組織的全 RNA 進行靈敏度試驗。Potyvirus Nib 基因檢測: 將 PVY 和 PepMoV 所感染的甜椒病株全 RNA, 以 PVY-Nib-350.1-F (5'-GTG TGT GTW GAT

GAY YTC AAY AA-3') 和 Potyvirus-Nib-350.1 (R) (5'-TCY ACA ACG GTR GAA GGT TGM CC-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, 檢測試驗則使用全 RNA (1 ng μL^{-1}) 為模版經 RT 轉為 cDNA 後進行 10 \times 系列稀釋 (估算 RNA 濃度由 1 ng μL^{-1} 至 10⁻⁷ ng μL^{-1}) 的方式, 取各稀釋液進行 RT-PCR 以及 real-time RT-PCR 反應。另外使用罹染 PVY 和 PepMoV 的甜椒植株全 RNA 做檢測; 分別將其全 RNA 以 10 \times 系列稀釋 (10 ng μL^{-1} 至 0.1 ag μL^{-1}) 的方式, 分別取用罹染 PVY 或 PepMoV 的全 RNA, 另混合相同濃度 (10 ng μL^{-1}) 之 PVY 和 PepMoV 全 RNA 進行靈敏度試驗, 分別進行 RT-PCR 及 real-time RT-PCR 反應, 其反應物及條件如前述。

評估以 real-time RT-PCR 檢測 PVY 和 PepMoV 的效率

核酸增幅效率確認包括一系列稀釋以確定多重反應中 PVY 和 PepMoV 引子/探針組合的擴增效率。將同時含有 PVY 和 PepMoV 的總量 RNA 稀釋至 10 ng μL^{-1} , 並使用 10 \times 系列稀釋至 1 \times 10⁻⁵ ng μL^{-1} 。Real-time RT-PCR 擴增時, 針對總量 RNA 濃度繪製每種稀釋液的 cycle threshold (Ct) 值。Ct 值大於 35 的稀釋液不包括在結果中。使用增幅效率 $Ex = 10^{(-1/\text{slope})}$ 從圖的斜率計算放大效率 (Ex) (Rasmussen 2001)。

結果

Real-time RT-PCR 對 PVY 和 PepMoV 的專一性測定

為確定上述所設計的引子和探針在檢測 PVY 或 PepMoV 樣品的試驗中是否具專一性，以 real-time RT-PCR 方法，分別與 PVY 感染甜椒植株、PepMoV 感染甜椒植株、健康的甜椒、健康的煙草、PVX 感染甜椒植株、CMV 感染甜椒植株、TMV 感染甜椒植株 ToMV 和感染甜椒植株的全 RNA 與 no template control (NTC) 對照組進行 real-time RT-PCR 反應，結果顯示添加兩組探針進行試驗：PVY 感染甜椒之組織具陽性反應 (如圖 1A)，Ct 值為 25.9，而對於其他甜椒病毒如 CMV、TMV、ToMV 和 PVX 及健康的甜椒，與作為負對照組之無菌水皆無反應，PepMoV 感染甜椒之組織具正反應 (如圖 1B)，Ct 值為 28.9，而對於其他甜椒病毒如 CMV、TMV、ToMV 和 PVX 及健康的甜椒，與作為負對照組之無菌水皆無反應，另外混合 PVY 和 PepMoV 病毒 RNA 亦可同時檢測 (如圖 1C) 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 PVY、PepMoV 病毒基因片段具有專一性。

RT-PCR 和 Real-time RT-PCR 對檢測 PVY 和 PepMoV 的靈敏度試驗

探討 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 對於檢測 PVY、PepMoV 的靈敏度，針對罹染 PVY 及 PepMoV 的甜椒全 RNA 檢測之。結果顯示以 RT-PCR 方法檢測 PVY、PepMoV 之靈敏度可至 10^{-1} ng (圖 2)；相同樣品以 real-time RT-PCR 方法檢測，靈敏度可至 10^{-3} ng (圖 3)。上述結果顯示，在檢測 PVY、PepMoV 靈敏度上，real-time RT-PCR 方法高於 RT-PCR 100 \times 。將上述 real-time RT-PCR 結果繪製成標準曲線圖 (圖 4)：設定縱座標為 Ct 值，橫坐標為 Potyvirus-Nib-350 RNA 量，則可獲得 PepMoV 標準曲線圖為 $R^2 = 0.991$ ($E = 96.59\%$)，PVY 標準曲線圖為 $R^2 = 0.994$ ($E = 103.24\%$)，本試驗結果可應用於定量病毒含量。

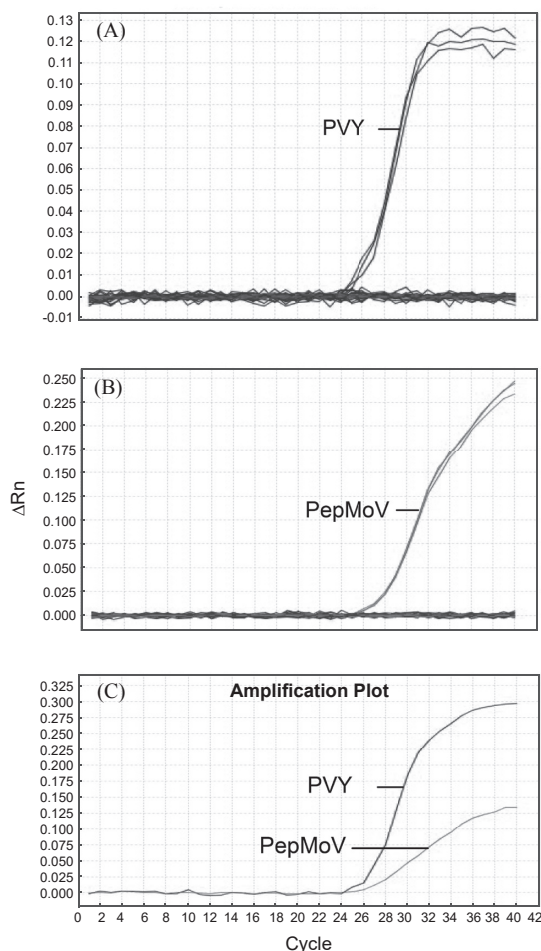


圖 1. Real-time RT-PCR 檢測 PVY 和 PepMoV 的專一性試驗。專一性受試材料顯示與 PVY 或 PepMoV 反應不與 PVX、TMV、ToMV、CMV 和 PMMoV 反應：(A) PVY 病毒檢測；(B) PepMoV 病毒檢測；(C) PVY + PepMoV 病毒檢測。

Fig. 1. Specificity of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of potato virus Y (PVY) and pepper mottle virus (PepMoV). The specific test of real-time RT-PCR showed that it reacts with PVY or PepMoV and does not react with potato virus X (PVX), tobacco mosaic virus (TMV), tomato mosaic virus (ToMV), cucumber mosaic virus (CMV) and pepper mild mottle virus (PMMoV). (A) PVY detection only; (B) PepMoV detection only; and (C) analysis for PVY + PepMoV.

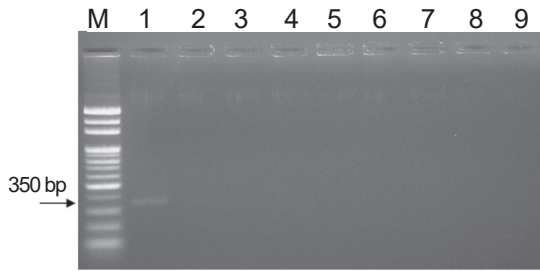


圖 2. RT-PCR 法進行靈敏度試驗檢測 PVY 及 PepMoV 之電泳圖結果。混合 PVY 及 PepMoV 全 RNA 之 $10\times$ 系列稀釋液 ($1-10^{-7}$ ng) 為模板。行 M: 100 bp 核酸分子標準液; 行 1-8 分別為 $1-10^{-7}$ ng 之核酸稀釋液; 行 9: NTC。

Fig. 2. Sensitivity detection of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for both potato virus Y (PVY) and pepper mottle virus (PepMoV). Mixed with PVY and PepMoV, $10\times$ serial dilutions of total RNA as templates ($1-10^{-7}$ ng). Lane M: 100 bp marker; lanes 1-8: $1-10^{-7}$ ng total RNA diluent; and lane 9: no template control (NTC).

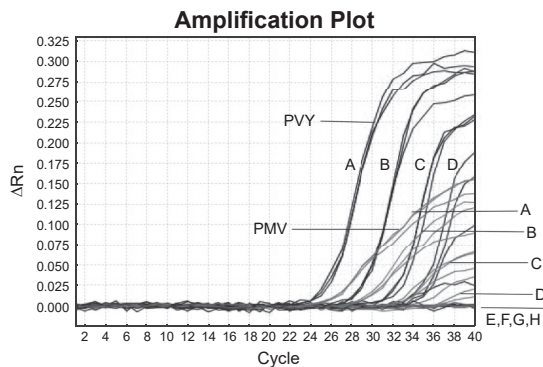


圖 3. Real-time RT-PCR 法進行靈敏度試驗檢測 PVY + PepMoV。縱軸: ΔRn 值; 水平軸: Ct 值; $10\times$ 系列稀釋之 PVY + PepMoV 全 RNA (A-H: 分別表示 $1-10^{-7}$ ng)。

Fig. 3. Sensitivity of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of potato virus Y (PVY) and pepper mottle virus (PepMoV). Vertical axis: ΔRn value; horizontal axis: cycle threshold (Ct) value; total RNA of PVY + PepMoV (A-H: $1-10^{-7}$ ng, respectively) by $10\times$ serial dilutions.

評估以 real-time RT-PCR 同時檢測甜椒上 PVY 和 PepMoV 的效率

PVY + PepMoV 的陽性檢出之 RNA 濃度均為 1×10^{-3} ng μL^{-1} , PVY 和 PepMoV 的 Ct 值

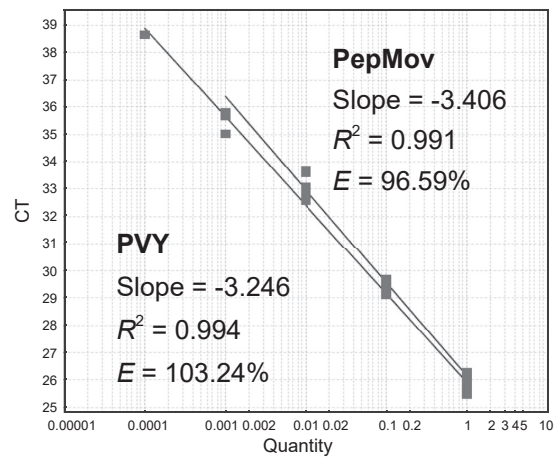


圖 4. Real-time RT-PCR 法檢測經系列稀釋之 PVY + PepMoV 其反應結果的標準曲線。計算其增加濃度與斜率之關係; $10\times$ 系列稀釋之 PVY 和 PepMoV 全 RNA ($1-10^{-7}$ ng)。

Fig. 4. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) slope calculation for potato virus Y (PVY) and pepper mottle virus (PepMoV) using the cycle threshold (Ct) slope method with increasing concentrations of total RNA positive for both PVY and PepMoV. The standard curve of real-time RT-PCR experiment results; PVY and PepMoV full RNA ($1-10^{-7}$ ng) in $10\times$ serial dilutions.

分別為 35.7 和 37.7。發現 PVY 的線性斜率為 -3.246, PepMoV 的線性斜率為 -3.406。PVY 和 PepMoV 的擴增效率的計算分別為 103.24% 和 96.59% (如圖 4)。

討論

由於田間生態相多樣性而發生多重病毒混合感染的情形十分普遍, 已有許多多重病毒檢測的研究發展以因應此現況。例如: 使用 RT-PCR 同時檢測 PVX、PVY、potato leaf roll virus (PLRV)、和 potato virus S 等 5 種馬鈴薯病毒 (Du *et al.* 2006); 使用免疫磁珠法同時檢測馬鈴薯病毒 PVY、PVX 和 PLRV (Bergervoet *et al.* 2008); RT-PCR 鑑定 PVY 和 PLRV 等 2 種馬鈴薯病毒 (Klerks *et al.* 2001); RT-PCR 檢測 TMV、CMV、tomato spotted wilt virus (TSWV)、tomato chlorosis virus (ToCV)、PVY 和 PVX 等 6 種番茄病毒 (Liu *et al.* 2019)。

RT-PCR 同時檢測甜椒 CMV、TMV、PMMoV、PVY 和 TSWV 等 5 種病毒 (Nemes & Salánki 2020)。甜椒在台灣常採用露天或設施栽培，為連續採果作物，且栽培過程需持續摘除側芽，推測可能去芽或採果時，或透過刀具汙染病毒而容易造成病毒傳播。此外，藉由蟲媒傳播的速度甚快，病毒病已成為台灣茄科作物栽培區常發生的病害之一。目前使用簡併式引子對 (degenerate primer) 進行 RT-PCR 方法可用於鑑定 *Potyvirus* 病毒屬，已被使用於茄科病毒檢測 (Gibbs & Mackenzie 1997; Chen & Adams 2001)。本研究使用通用引子對 *Potyvirus*-Nib-350.1-F/R 以一般 RT-PCR 法檢測結果，顯示只對馬鈴薯 Y 屬病毒 (如 PVY 和 PepMoV) 產生 350 bp 產物，與其他 *Cucumovirus*、*Potexvirus*、*Tobamovirus*、*Carmovirus* 屬之受測病毒皆不反應 (結果未出示)，此序列來自於病毒 Nib 基因序列為高度保留區域，已知可偵測近 40 種 *Potyvirus* isolates，過去文獻報導使用 WCIEN 或 *Potyvirus* 之引子只能鑑定 50–80% 的 *Potyvirus* isolates；但仍有少數 *Potyvirus* 因僅有外殼蛋白 (coat protein; CP) 基因的資訊，缺乏 Nib 之序列資料，故無法以此基因進行鑑定 (Zheng *et al.* 2010)。於 real-time RT-PCR 檢測結果顯示 (圖 1)：使用 *Potyvirus*-Nib-350.1-F/R 引子組加上 PVY 與 PepMoV 探針組進行反應，亦僅對罹染 PVY 或 PepMoV 之馬鈴薯 Y 屬病毒之甜椒植株組織有反應，而對健康的甜椒和番茄、罹染 CMV、PVX、TMV、PMMoV 或 ToMV 的甜椒植株組織則均為陰性反應。經由上述兩個試驗結果顯示，本研究設計的 *Potyvirus*-Nib-350.1-F/R 引子對以 RT-PCR 及 real-time RT-PCR 方法檢測皆對 PVY 和 PepMoV 病毒基因片段具有專一性。

PVY 和 PepMoV 為常見危害茄科作物的病毒者，在台灣過去的調查發現檢測樣本中，PepMoV 亦常伴隨與不同 *Potyvirus* 屬病毒複合感染 (Cheng *et al.* 2013)。Cheng *et al.* (2013) 利用 PepMoV-TW1 的鞘蛋白製備多元抗血清。此抗血清除與 PepMoV 具強烈反應，但發現與台灣茄科作物常見之 PVY 仍有中強度血清反應，進行 ELISA 檢測時僅藉由光學吸光值之呈色強度加以判別似乎不易區分。因此以 PepMoV

和 PVY 抗血清無法區分 PepMoV 和 PVY 此 2 種病毒。本研究使用 *Potyvirus* 病毒 Nib 基因，針對病毒特異區序列設計出 PVY 及 PepMoV 專一性探針，並可鑑定此 2 種病毒。而本研究利用 PepMoV、PVY RNA 方式進行 real-time PCR 試驗，結果顯示檢測靈敏度可至 10^{-3} ng，並建立 PVY 及 PepMoV 病毒標準曲線。RT-PCR 檢測法之靈敏度可至 10^{-1} ng，本研究結果顯示在檢測 PVY 和 PepMoV 靈敏度上，real-time RT-PCR 方法高於 RT-PCR 100 \times 。此靈敏度在全 RNA 之結果稍低，推測可能與感染植物 PepMoV RNA 含量之多寡有關。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。然而，本研究設計的引子對屬於簡併式的通用引子對，應用於 RT-PCR 檢測時，具有廣效性檢測同屬不同病毒之效果，均已見諸於國內外報告；就本報告的技術研發上，以 multiplex RT-PCR 技術進行病毒檢測僅需使用一對引子 (primer pair)，本試驗首次應用於 PepMoV 和 PVY 之鑑定，具有操作便利及縮短個別病毒鑑定流程之優點；另外，此技術亦說明可以在同屬病毒間序列十分相似的區域裡找出相異的序列，作為區分不同種的鑑別技術。由本研究結果顯示，real-time RT-PCR 對於 *Potyvirus* 的檢出率高於 RT-PCR，且由結果推測 real-time PCR 法在低濃度之 PVY 感染植株中，仍具有可檢測出此病毒之優點，因此利用 real-time PCR 法，將有助於作為田間病害早期診斷之依據。

引用文獻

- Abdalla, O. A., P. R. Desjardins, and J. A. Dodds. 1991. Identification, disease incidence, and distribution of viruses infecting peppers in California. *Plant Dis.* 75:1019–1023. doi:10.1094/PD-75-1019
- Benner, C. P., C. W. Kuhn, J. W. Demski, J. W. Dobson, P. Colditz, and F. W. Nutter. 1985. Identification and incidence of pepper viruses in northeastern Georgia. *Plant Dis.* 69:999–1001.
- Bergervoet, J. H., J. Peters, J. R. van Beckhoven, G. W. van den Bovenkamp, J. W. Jacobson, and J. M. van der Wolf. 2008. Multiplex microsphere immuno-detection of potato virus Y, X and PLRV. *J. Virol. Methods.* 149:63–68. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.020

- Chen, J. and M. J. Adams. 2001. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Arch. Virol.* 146:757–766. doi:10.1007/s007050170144
- Cheng, Y. H., R. Y. Wang, C. C. Chen, C. A. Chang, and F. J. Jan. 2009. First report of *Pepper vein mottle virus* in tomato and pepper in Taiwan. *Plant Dis.* 93:107. doi:10.1094/PDIS-93-1-0107A
- Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, J. Y. Liao, C. A. Chang, and C. H. Chiang. 2011. First report of *Pepper mottle virus* in bell pepper in Taiwan. *Plant Dis.* 95:617. doi:10.1094/PDIS-10-10-0721
- Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, C. P. Kuan, and C. A. Chang. 2013. Identification and occurrence of *Pepper mottle virus* isolated from peppers in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 62:360–371. doi:10.6156/JTAR/2013.06204.06 (in Chinese with English abstract)
- Crosslin, J. M. 2012. PVY: An old enemy and a continuing challenge. *Amer. J. Potato Res.* 90:2–6. doi:10.1007/s12230-012-9286-8
- 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. doi:10.1071/APP9910161
- Du, Z., J. Chen, and C. Hiruki. 2006. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Dis.* 90:185–189. doi:10.1094/PD-90-0185
- Gibbs, A. and A. Mackenzie. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 63:9–16. doi:10.1016/S0166-0934(96)02103-9
- 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. J. Phytopathol.* 75:109–111. doi:10.3186/jjphytopath.75.109
- Han, J. H., H. S. Choi, D. H. Kim, H. R. Lee, and B. D. Kim. 2006. Biological, physical and cytological properties of pepper mottle virus-SNU1 and its RT-PCR detection. *Plant Pathol. J.* 22:155–160.
- Kim, M. S., M. J. Kim, J. S. Hong, J. K. Choi, and K. H. Ryu. 2009. Patterns in disease progress and the influence of single and multiple viral infections on pepper (*Capsicum annuum* L.) growth. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:53–61. doi:10.1007/s10658-009-9570-8
- Klerks, M. M., G. O. Leone, M. Verbeek, J. F. van den Heuvel, and C. D. Schoen. 2001. Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of *Potato leafroll virus* and *Potato virus Y* in potato tubers. *J. Virol. Methods.* 93:115–125. doi:10.1016/s0166-0934(01)00258-0
- Kubota, K., T. Usugi, and S. Tsuda. 2011. Production of antiserum and immuno- detection of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a novel whitefly-transmitted crinivirus. *J. Gen. Plant Pathol.* 77:116–120. doi:10.1007/s10327-010-0287-5
- Lee, S. T. 1970. Studies on some naturally occurring strains of *Potato virus Y* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 12:41–50. (in Chinese)
- Liu, H., K. Wu, W. Wu, W. Mi, X. Hao, and Y. Wu. 2019. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of six main RNA viruses in tomato plants. *J. Virol. Methods.* 265:53–58. doi:10.1016/j.jviromet.2018.12.011
- Mackay, I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:190–212. doi:10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x
- Nemes, K. and K. Salánki. 2020. A multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of prevalent viruses infecting pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Virol. Methods.* 278:113838. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113838
- Purcifull, D. E., T. A. Zitter, and E. Hiebert. 1975. Morphology, host range, and serological relationships of pepper mottle virus. *Phytopathology* 65:559–562. doi:10.1094/Phyto-65-559
- Quenouille, J., N. Vassilakos, and B. Moury. 2013. *Potato virus Y*: A major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* 14:439–452. doi:10.1111/mpp.12024
- Rasmussen, R. 2001. Quantification on the LightCycler. p.21–34. *in: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications* (Meuer, S., C. Wittwer, and K. I. Nakagawara, eds.) Springer. Heidelberg, Germany. 408 pp.
- Scholthof, K. B. G., S. Adkins, H. Czosnek, P. Palukaitis, E. Jacquot, T. Hohn, B. Hohn, K. Saunders, T. Candresse, P. Ahlquist, C. Hemenway, and G. D. Foster. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12:938–954. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x
- Shukla, D. D., C. W. Ward, and A. A. Brunt. 1994. *The Potyviridae*. CAB International. Wallingford, CT. 516 pp.
- Zheng, L., P. J. Wayper, A. J. Gibbs, M. Fourment, B. C. Rodoni, and M. J. Gibbs. 2008. Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. *PLoS ONE* 3:e1586. doi:10.1371/journal.pone.0001586
- Zheng, L. B., C. Rodonibc, M. J. Gibbsab, and A. J. Gibbsd. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathol.* 59:211–220. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x

Development of Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Identify and Detect Potato Virus Y and Pepper Mottle Virus in Sweet Pepper

Cheng-Ping Kuan^{1*}, Ying-Huey Cheng², Chia-Hsin Tsai³, Ching-Shan Tseng¹, and Tso-Chi Yang⁴

Abstract

Kuan, C. P., Y. H. Cheng, C. H. Tsai, C. S. Tseng, and T. C. Yang. 2022. Development of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction to identify and detect potato virus Y and pepper mottle virus in sweet pepper. *J. Taiwan Agric. Res.* 71(1):11–18.

The real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was, for the first, developed to identify and differentiate potato virus Y and pepper mottle virus in sweet pepper. The results showed that this nucleic acid amplification technology can simultaneously detect both potato virus Y and pepper mottle virus. No amplification was obtained from other *Solanaceae* viruses and healthy plants. The method can be used to identify single or multiple infections. The results indicated that this quantitative RT-PCR has the advantages of good specificity and high sensitivity. The technology will be applied to assess field surveillance for sweet pepper.

Key words: Potato virus Y, Pepper mottle virus, Detection, Real-time RT-PCR.

Received: April 14, 2021; Accepted: October 12, 2021.

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

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

² Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

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

⁴ Research Fellow and Division Director, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.