

## 利用溫度處理與直接組織轉漬法增進夜來香 種球病毒檢定準確性之研究

陳金枝<sup>1</sup> 張清安<sup>1,2</sup>

1. 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所植物病理系
  2. 連絡作者：電子郵件 cachang@wufeng.tari.gov.tw；傳真 04-3331089
- 接受日期：中華民國88年6月30日

### 摘 要

陳金枝、張清安。1999. 利用溫度處理與直接組織轉漬法增進夜來香種球病毒檢定準確性之研究. 植病會刊 8:83-88.

本省栽培之夜來香普遍受夜來香微嵌紋病毒 (tuberose mild mosaic potyvirus, 簡稱TMMV) 之感染, 感病植株葉片及花軸均會出現輕微嵌紋病徵。本實驗比較酵素連結抗體吸附法 (ELISA) 與直接組織轉漬法 (Direct tissue blotting, DTB) 對偵測夜來香組織中TMMV之效果, 試驗發現當樣品中病毒濃度高時, DTB與ELISA檢測所得之病毒檢出率並無差異。但是當樣品中病毒濃度較低時, 葉片樣品以ELISA檢測所得之病毒檢出率較DTB之結果高, 此現象應與ELISA結果可以數據化而較容易判斷有關; 不過當檢定對象為種球時, 結果顯示縱使病毒濃度低於ELISA檢出範圍, DTB法仍可獲得較高之病毒檢出率, 此現象可能與病毒在種球頂端鱗葉中傾向於累積在特定位置, 而容易以DTB法判別出來有關。總之, 我們認為當檢定對象為夜來香葉片時, 應以ELISA進行檢測, 而檢定對象為夜來香種球時, 則以DTB為較佳之選擇。由於夜來香種球採收後於下一季栽培前通常儲藏於 5 °C 環境下, 本實驗長期監測冷藏種球組織內所含 TMMV 之濃度變化, 發現病毒濃度在冷藏一個月後約下降 40%, 二個月後即降低至ELISA所能檢測之臨界點範圍, 冷藏六個月後則僅剩三分之一之種球仍可被 ELISA 檢測到病毒存在。不過如果應用DTB檢測法, 則本試驗所有之冷藏處理種球均可被檢出病毒存在, 此結果再度印證DTB之敏感度確實比ELISA高。本實驗進一步發現利用 25 °C 回溫處理經長期冷藏之種球, 可於二天內迅速提升種球組織內之病毒濃度, 促使其達到百分之百被ELISA檢出之濃度範圍, 同時也對DTB結果之判斷有正面之幫助。綜合本研究結果我們建議當檢定夜來香種球時, 以 DTB法配合 25 °C 種球回溫處理二天, 可增進將病毒檢出之效果, 加上DTB在取樣操作上比ELISA更為簡便及有效率, 極適合作為未來無病毒夜來香種球生產或進出口種球檢疫認證時, 針對大量種球之標準檢定方法。

關鍵詞：夜來香、夜來香微嵌紋病毒、溫度處理、病毒檢定、直接組織轉漬法

### 緒 言

夜來香 (*Polianthes tuberosa* L.), 又稱晚香玉, 屬龍舌蘭科, 原產於墨西哥<sup>(12)</sup>, 三百多年前引進台灣栽培, 除作切花外, 亦可提煉香精, 目前已成為本省重要的球根花卉<sup>(3, 11)</sup>, 主要栽培於中南部之嘉義、虎尾及屏東地區。近年來本研究室之調查結果顯示, 目前本省栽培之夜來香切花用重瓣品系幾乎已全面感染夜來香微嵌紋病毒 (tuberose mild mosaic potyvirus, 簡稱TMMV)<sup>(2, 5)</sup>, 植株葉片及花軸上極易觀察到微嵌紋病徵。TMMV在夜來香植株各部位及貯藏期種球上之濃度分布並不均勻, 因此針對不同樣品之

檢測, 必須調整適當之採樣方法, 才能提升病毒檢定結果之正確性, 本研究室過去之實驗中已經掌握針對檢定夜來香植株及種球中之TMMV所應採取之最佳採樣方法<sup>(6)</sup>。不過當時僅採用酵素連結抗體吸附法 (ELISA) 進行檢定, 而並未比較其他血清學方法在夜來香病毒檢定上之適用性。根據文獻之記載, 除 ELISA 外, 直接組織轉漬法 (direct tissue blotting, DTB) 亦極適合於大量樣品之篩檢, 有些報告指出其效率及敏感度甚至優於 ELISA<sup>(4, 8, 9, 10)</sup>。由於本省除生產夜來香切花外, 其種球亦為重要之生產項目, 而且近年來外銷種球之數量年年增加, 有逐漸形成產業化之趨勢<sup>(3)</sup>。為因應此項潮流, 我們認為應針對夜來香種球之

病毒檢定，重新檢討現行檢定方法之適用性，尤其測試DTB在檢定大量夜來香樣品時之適用性，以找出最佳之檢定模式供產業界應用，進一步提昇我國未來夜來香產業之競爭力。本文乃敘明我們探討溫度變化在夜來香種球儲藏期間對其組織內TMMV濃度之影響，及比較ELISA與DTB應用在檢定夜來香病毒上之差異。

## 材料與方法

### 供試夜來香來源

本研究所使用之夜來香種球均採取自經血清檢定確知感染TMMV之植株，採收後挑選直徑約2~2.5公分，外觀正常之種球，經清理及風乾後冷藏於5℃定溫箱備用。

### ELISA檢定法

本研究各項ELISA試驗乃採用直接型酵素連結雙抗體包夾法(Direct double antibody sandwiched enzyme-linked immunosorbent assay, 簡稱ELISA)<sup>(1,7)</sup>，詳細之測定流程及使用之TMMV抗血清均如已發表之報告所述<sup>(6)</sup>。進行檢定時均採取0.1 g之植物組織，以3 ml之50 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.5) 研磨成粗汁液後不過濾，直接進行ELISA檢定，反應最終結果乃以EIA讀值儀(E-Max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)於添加鹼性磷酸基質後2小時，讀取波長405 nm下之吸收值，作為評估TMMV濃度高低之依據。

### DTB檢定法

本檢定法係採用Lin *et al*<sup>(10)</sup>所發展之方法加以修飾而成。檢定夜來香葉片時乃將狹長之葉片由葉尖往葉基捲成圓筒狀，再以刀片橫切，並立刻將切面印漬於Nylon膜(Stratagene, La Jolla, CA)上。檢定種球時，乃以刀片橫切球根頂端鱗葉組織<sup>(3)</sup>，再將切面印漬於Nylon膜。採樣印漬完成後需待組織液乾燥，再將Nylon膜浸泡於blocking溶液(含5%脫脂奶粉之PBS緩衝液)中反應30~60分鐘。其後將Nylon膜移入稀釋1200倍之TMMV抗體IgG溶液(1 mg/ml)中反應2小時，之後以1x PBST溶液震盪洗滌三次，每次10分鐘，再移入稀釋6000倍之山羊抗兔免疫球蛋白(goat anti-rabbit IgG, Jackson, West Grove, PA)溶液中繼續反應2小時，之後經同法之PBST洗滌三次後加入BCIP/NBT呈色液(alkaline phosphatase substrate kit, Bio-Rad, Hercules, CA)進行反應，待罹病組織對照組呈現藍黑色反應後(約5~10分鐘)，倒去呈色液，再以自來水沖洗Nylon膜以中止反應。本項檢定法之各項反應均於室溫下進行，病毒檢定正反應結果係以樣品轉漬印出現與健全對照樣品轉漬印有明顯差異之藍黑色反應作為判斷之依據。

### ELISA與DTB檢測夜來香葉片及種球組織內TMMV

### 之效果比較

本試驗分別以ELISA及DTB檢測夜來香葉片(包括植株之新葉、老葉及組織培養瓶苗葉片)及種球(包括未冷藏及冷藏種球)各100個樣品，ELISA之反應值大於0.15者為正反應<sup>(6)</sup>，再依各反應值區分為<0.15、介於0.15~0.5間、介於0.5~1.0間及1.0四個等級，並歸納各等級內以DTB檢出為正反應之樣品數，以評估此二種檢定法之差異。

### 低溫冷藏對夜來香種球內TMMV濃度之影響

為了解夜來香種球經冷藏後，其組織內TMMV之濃度變化並比較ELISA及DTB檢測TMMV之差異性。本試驗取採收後經風乾之夜來香種球，將其置於5℃冷藏箱中，於冷藏前及冷藏後六個月內，每個月取出15個種球，採取鱗葉部位分別以ELISA及DTB進行TMMV之檢測。

### 溫度處理對檢定夜來香種球內TMMV之影響

取10個已冷藏於5℃中12個月之夜來香種球，先浸泡於水中60分鐘後，再置於25℃定溫箱中進行回溫處理，於處理後第1、2、3、4、5、10天分別切取部分頂端鱗葉組織，進行ELISA及DTB檢測並計算病毒檢出率。

## 結 果

### ELISA與DTB對夜來香組織內TMMV偵測效果之比較

#### 一、針對植株葉片之檢測

利用ELISA與DTB同時檢測100片夜來香葉片組織中之TMMV，結果顯示有48個葉片樣品其EIA值大於0.5，此為確定受病毒感染，而這48個樣品以DTB檢測結果亦屬正反應。另外有46個樣品其EIA值介於0.15~0.5，符合病毒感染之範圍，然而這46個樣品中卻只有38個在DTB檢測下屬於正反應，其中有8個葉片樣品其轉漬印上並無任何可判斷之呈色反應(表一)。其次尚有6個樣品其EIA值小於0.15，落於ELISA檢定法中未受病毒感染之範圍，但是其中卻有3個樣品在DTB之檢測下，其轉漬印顯出正反應之結果(表一)。總計100個夜來香葉片樣品中，利用ELISA可檢出94個樣品帶有TMMV，而以DTB法則僅檢出89個樣品受病毒感染。因此對於葉片之檢定效果而言，ELISA之病毒檢出率高於DTB之檢出率。

表一、比較ELISA及direct tissue blotting (DTB) 免疫偵測法檢測夜來香葉片及種球頂端鱗葉組織中之夜來香微嵌紋病毒之敏感度<sup>1</sup>

Table 1. Comparison of the sensitivity of ELISA and direct tissue blotting (DTB) for the detection of tuberose mild mosaic potyvirus (TMMV) from the tuberose leaf and apical scale leaf tissue of bulbs.<sup>1</sup>

Tissue	ELISA results		No. of sample detected by DTB
	EIA reading	Sample no.	
Leaf	1.0	25	25
	0.5 1.0	23	23
	0.15 0.5	46	38
	< 0.15 <sup>2</sup>	6	3
Bulb	1.0	40	40
	0.5 1.0	14	14
	0.15 0.5	27	27
	< 0.15 <sup>2</sup>	19	19

<sup>1</sup>. Double antibody sandwiched ELISA and DTB as described in the text were compared for their sensitivity to detect TMMV from the tuberose leaves and apical scale leaf tissue of bulbs. EIA readings are the absorbance value at 405 nm taken 120 min after the addition of enzyme substrate solution. A total of 100 leaf and bulb samples taken from known TMMV-infected plants were indexed in this experiment. Samples were divided into 4 categories based on the EIA readings obtained from ELISA results. The same samples from each category were subsequently indexed by DTB and the numbers of sample positively detected were shown.

<sup>2</sup>. Samples with EIA readings lower than 0.15 are considered undetectable by ELISA.

## 二、針對種球之檢測

分別以ELISA及DTB檢測100個取自確定感染TMMV植株之夜來香種球，結果顯示有81個種球樣品其EIA值大於0.15，乃確定屬於病毒感染，而這81個種球以DTB檢測後亦獲得明顯之正反應結果（表一）。另外有19個種球樣品其EIA值小於0.15，以ELISA之標準而言應屬未感染病毒之範圍，但是這19個樣品在DTB之檢測下其轉漬印均能顯出正反應之結果（表一）。總計100個種球樣品中，以ELISA可檢出81個帶有TMMV，而以DTB則可將所有100個樣品完全檢出，顯示對於檢定夜來香種球之效果而言，DTB法明顯優於ELISA。

## 低溫冷藏對夜來香種球內TMMV濃度之影響

將一批採自確定感染TMMV之夜來香種球置於5℃之定溫箱下冷藏，每經一個月取出15個，分別以ELISA及DTB檢測其頂端鱗葉組織內之TMMV，結果如表二所示，冷藏處理前之種球所測得之EIA值平均為 $2.04 \pm 0.16$ ，顯

表二、利用5℃冷藏處理夜來香種球後對其頂端鱗葉組織內夜來香微嵌紋病毒之濃度及被檢出率之影響<sup>1</sup>

Table 2. Concentration and percent of detection by ELISA and direct tissue blotting (DTB) of tuberose mild mosaic potyvirus (TMMV) in the apical scale leaf tissue of tuberose bulbs before and after 5℃-storage treatment.<sup>1</sup>

Months after storage at 5℃	ELISA results		% of detection <sup>3</sup> by DTB
	% of detection <sup>3</sup>	Av. EIA reading <sup>2</sup>	
0	100	$2.04 \pm 0.16$	100
1	100	$1.18 \pm 0.12$	100
2	93	$0.35 \pm 0.02$	100
3	93	$0.44 \pm 0.05$	100
4	87	$0.40 \pm 0.06$	100
5	87	$0.66 \pm 0.10$	100
6	33	$0.27 \pm 0.06$	100

<sup>1</sup>. More than 200 bulbs collected from TMMV-infected tuberose plants were used in this study. Fifteen bulbs were sampled and indexed by ELISA and DTB before and every month after storing at 5℃ cold room. Double antibody sandwiched ELISA and direct tissue blotting (DTB) as described in the text were used for the indexing of TMMV. Concentrations of TMMV in the apical scale leaf tissue of tuberose bulbs are indicated by the EIA readings of ELISA.

<sup>2</sup>. EIA readings are the absorbance value at 405 nm taken 120 min after the addition of enzyme substrate solution. Figures are the averages with standard error of EIA readings only from those samples with positive reactions (EIA reading exceed 0.15).

<sup>3</sup>. (No. of bulbs with TMMV infection positively detected divided by 15 bulbs sampled in each treatment) x 100%

示病毒濃度極高。然而冷藏後第一個月其EIA值即降為 $1.18 \pm 0.12$ ，僅為冷藏前之58%，而且爾後逐月快速下降，於冷藏6個月後其EIA平均值已幾乎接近正反應之臨界值（表二），顯示長期低溫冷藏對於TMMV在夜來香種球內之濃度累積有不利之影響。此外，種球檢測出有病毒之樣品數亦隨著冷藏月數之增加而減少。冷藏至第6個月時，15個樣品中僅有5個可被檢出帶有TMMV，檢出率由冷藏前之100%降為33%（表二）。然而本試驗另以DTB法同時檢測各處理之種球時，根據種球轉漬印之呈色深淺判斷（結果未出示），如同ELISA之結果一樣，其病毒濃度亦有逐月下降之情形，但各處理之所有種球均能百分之百達到DTB檢出正反應之標準（表二），此結果再次證明應用DTB檢測夜來香種球之敏感度優於ELISA。

## 回溫處理對檢測夜來香種球上TMMV之影響

由上述種球冷藏試驗結果得知，夜來香種球經冷藏後，其組織內之TMMV濃度會逐漸降低，進而影響種球被ELISA檢出帶有病毒之比率。本試驗乃進一步將持續冷藏12個月之種球取出，置於25℃下回溫處理，再以ELISA檢

測種球組織內之病毒濃度，發現未經回溫處理之冷藏種球其EIA平均值僅為 $0.26 \pm 0.05$ ，若作回溫處理，則於處理後第一天測得之EIA值迅速增至 $0.73 \pm 0.06$ ，第二天後甚至增至 $0.96 \pm 0.16$ ，而且隨著回溫處理時間之增長，所測得之EIA值逐漸增加（表三），顯示回溫處理的確可明顯提升TMMV在夜來香種球頂端鱗葉組織上所累積之濃度。試驗中進一步評估此回溫處理對病毒檢出率之影響，發現以ELISA檢測時，於回溫後第一天所測得之病毒檢出率為70%，而處理二天以上者均可獲得100%之病毒檢出率（表三），顯示種球經回溫處理兩天後，可穩定地被檢出是否帶有病毒。另以DTB法檢測未經回溫處理之冷藏對照種球或經回溫處理者，均可百分之百達到DTB檢出正反應之標準，而且試驗結果證實經回溫處理過之種球，其轉漬印較未經回溫處理者不僅呈色較深，而且其呈色明顯均勻分佈於轉漬印上，使正反應結果之判斷更為容易（圖一）。此結果更印證夜來香冷藏種球於回溫處理後，其組織內病毒濃度迅速提升之現象。

討 論

表三、利用25 回溫處理經長期冷藏之夜來香種球對其頂端鱗葉組織內夜來香微嵌紋病毒之濃度及被檢出率之影響

Table 3. Effect of 25 treatment on the concentration and detection rate of tuberose mild mosaic potyvirus (TMMV) in apical scale leaf tissue of tuberose bulb stored in cold. <sup>1</sup>

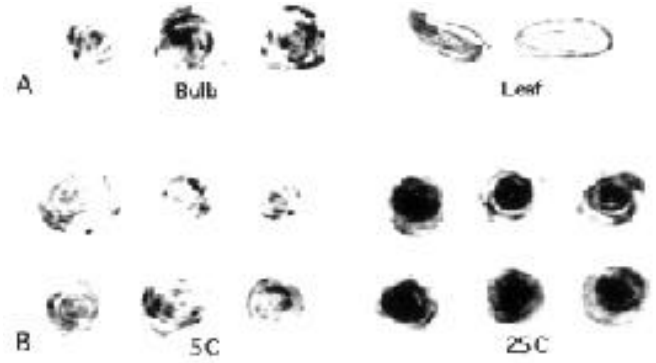
Days after 25 treatment	ELISA results		% of detection <sup>3</sup> by DTB
	Avg. EIA reading <sup>2</sup>	% of detection <sup>3</sup>	
0	$0.26 \pm 0.05$	50	100
1	$0.73 \pm 0.06$	70	100
2	$0.96 \pm 0.16$	100	100
3	$0.81 \pm 0.15$	100	nt <sup>4</sup>
4	$1.09 \pm 0.27$	100	nt
5	$1.99 \pm 0.36$	100	nt
10	$1.85 \pm 0.45$	100	100

<sup>1</sup>. Ten tuberose bulbs collected from TMMV-infected plants and stored at 5 for 12 months were used in this test. About 0.1 g of tissue from the apical scale leaves of each bulb was dissected before and each testing day after 25 recovered treatment for the detection of TMMV by ELISA and direct tissue blotting (DTB) as described in the text. Concentrations of TMMV in the apical scale leaf tissue of tuberose bulbs are indicated by the EIA readings of ELISA.

<sup>2</sup>. EIA readings are the absorbance value at 405 nm taken 120 min after the addition of enzyme substrate solution. Figures are the averages with standard error of EIA readings only from those samples with positive reactions (EIA reading exceed 0.15).

<sup>3</sup>. (No. of bulbs with TMMV infection positively detected divided by 10 bulbs) x 100%

<sup>4</sup>. nt : not tested.



圖一、利用直接組織轉漬法檢測夜來香種球及葉片中微嵌紋病毒之感染。(A)比較夜來香葉片與種球頂端鱗葉轉漬印呈色之差異；(B)比較冷藏種球經25 回溫處理前後頂端鱗葉轉漬印呈色之差異。

Fig. 1. Photographs showing the results of direct tissue blotting test for the detection of tuberose mild mosaic potyvirus in tuberose leaves and bulbs. (A) Differences between tissue blots from the leaves and bulbs, showing that dense spots are commonly observed in blots from apical scale leaf tissue of bulbs but not from leaf tissue; (B) Differences between tissue blots from the storage bulbs before and after 25 treatment.

本研究探討ELISA與DTB對夜來香組織內TMMV偵測效果之差異，試驗結果顯示當檢定對象為葉片時，ELISA檢測所得之病毒檢出率高於DTB檢測之結果，然而當檢測對象為種球時則結果剛好相反，DTB檢定法之敏感度較高。我們根據葉片與種球頂端鱗葉組織在Nylon膜上之轉漬印呈色結果判斷，葉片組織內所含病毒濃度較為均勻，不會因不同部位而有明顯差異，也就是說在轉漬印上之顏色分佈均勻，沒有特定之病毒累積點（圖一，A）。反之，種球之鱗葉組織中病毒分佈並不平均，尤其當整體組織中病毒濃度下降時，在其轉漬印上仍可見到特定之病毒累積點（圖一，A），因此當以DTB檢測時，此種病毒累積點有助於正反應結果之判斷，推測此乃DTB可將所有EIA值低於正反應臨界值（0.15）之種球樣品全數測出之主要原因（表一）。但在葉片材料中由於病毒分佈均勻，缺乏病毒特定累積點，因此當病毒濃度偏低時，利用DTB檢測很難判斷出正反應之樣品，此現象可由表一中明顯看出：ELISA檢測之EIA值屬於正反應範圍之46個葉片樣品中，只有38個可被DTB檢出。這當然要歸功於ELISA檢測之結果可以數據化，尤其可依無病毒對照樣品之EIA值決定正反應標準臨界值，因此在判斷上有所依據而可獲得較高之檢出率。

夜來香種球狀似圓錐筒狀，其構造可區分為頂端鱗葉、側芽及基盤三個部位<sup>(3)</sup>，過去之研究發現鱗葉組織為整個種球構造中含TMMV濃度最高者<sup>(6)</sup>，其橫切面為多層鱗葉所圍成之同心輪狀。進行DTB檢定取樣時，操作者能

輕易地切取其橫切面，且均勻地將切面之組織液轉漬於 Nylon 膜上，並不會危及取樣種球之繼續生長，此程序遠比 ELISA 檢定時之研磨操作更為簡便有效率，尤其能夠在短時間內處理大量種球樣品。因此應用 DTB 於夜來香種球檢定時，除了具有前述之高敏感度外，在採樣與檢定流程中，亦有操作方便之優點。綜合以上所述，對於不同部位之夜來香樣品進行病毒檢定時，應選擇適合之檢定方法才能獲得較正確之結果。面對植株葉片樣品時，應選用 ELISA 進行檢測較佳；若樣品為種球，則以 DTB 法為較佳之選擇。

一般農民栽培夜來香之慣例，當種球於採收風乾後若不立即種植，通常需加以冷藏，否則於室溫下放置 2~3 個月，種球即開始長出新芽及葉片，失去栽培價值。一般所使用之 5℃ 冷藏具有保持種球之完整與調節花期之效果<sup>(3, 11)</sup>。本試驗測試夜來香種球經冷藏後對鱗葉組織內之 TMMV 濃度及其檢出率之影響，結果顯示種球進入冷藏後，其組織內病毒濃度會持續降低，因而影響 ELISA 檢出病毒之效果(表二)。此種長期冷藏之種球經 25℃ 回溫處理後，其組織內 TMMV 之濃度可在二天內迅速提昇，達到百分之百被 ELISA 檢出之效果(表三)。雖然種球回溫處理與否對於 DTB 而言並無絕對必要，但是我們發現種球經回溫處理後，鱗葉內之病毒濃度可明顯迅速地提升，使鱗葉切面之轉漬印呈色更強且更加均勻，而有助於正反應之判別(圖一，B)。故結合種球回溫處理與 DTB 檢定法，不僅可提升檢定結果之正確性，且由於其操作上之簡便與高效率，未來於夜來香無病毒種球生產或進出口種球檢疫認證時，面對大量樣品，深具實用價值。

## 謝 辭

本研究承農委會科技計畫(84-科技-2.4-糧-42、85-科技-1.6-糧-11、86-科技-1.6-糧-29及87-科技-1.3-糧-26)經費補助及實驗室江芬蘭小姐協助試驗工作之進行，謹此表達由衷謝意。研究過程中，蒙嘉義技術學院園藝科沈再木、黃達雄及杜柏勳老師提供研究材料與分享研究經驗心得，在此一併致謝。

## 引用文獻

1. 張清安. 1996. 植物病毒鑑定及診斷新技術. 植物保護新科技研討會專刊. P. 35-45. 台灣省農業試驗所特刊第57號. 台灣省農業試驗所編印. 207頁。
2. 陳金枝、張清安、江芬蘭. 1995. 本省夜來香微嵌紋病毒發生之調查與鑑定. 植保會刊 37:446。
3. 黃達雄、沈再木、沈榮壽、黃光亮. 1996. 夜來香之種球及切花生產. 球根花卉研討會專刊. P. 106-121. 農林廳種苗改良繁殖場編印。
4. Bravo-Almonacid, F., Haim, L., and Mentaberry, A. 1992. Rapid immunological detection of potato viruses in plant tissue squashes. *Plant Dis.* 76: 574-578.
5. Chen, C. C., and Chang, C. A. 1998. Characterization of a potyvirus causing mild mosaic on tuberose. *Plant Dis.* 82: 45-49.
6. Chen C. C., Chiang, F. L., and Chang, C. A. 1998. Distribution of tuberose mild mosaic potyvirus in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) and its influence on virus detection. *Plant Pathol. Bull.* 40: 199-207.
7. Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
8. Hsu, H. T., and Lawson, R. H. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in Impatiens. *Plant Dis.* 75: 292-295.
9. Hsu, H. T., Vongsasitorn, D., and Lawson, R. H. 1992. An improved method for serological detection of Cymbidium mosaic potyvirus in orchids. *Phytopathology* 82: 491-495.
10. Lin, N. S., Hsu, Y. H., and Hsu, H. T. 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80: 824-828.
11. Shen, T. M., Shen, R. S., and Huang, K. L. 1991. Studies on the flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science* 37 (1): 10-20.
12. Trueblood, E. W. E. 1973. 'Omixochitl' the Tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Economic Botany* 27: 157-173.

## ABSTRACT

Chen C. C.<sup>1</sup>, and Chang, C. A.<sup>1,2</sup> 1999. The improvement for the detection of tuberose mild mosaic potyvirus in tuberose bulbs by temperature treatment and direct tissue blotting. *Plant Pathol. Bull.* 8:83-88. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wu-Feng, Taichung 413, Taiwan, R. O. C. ; <sup>2</sup> Corresponding author, E-mail: cachang@wufeng.tari.gov.tw , Fax No: 04-3331089)

Tuberose mild mosaic potyvirus (TMMV) is widely distributed in tuberose (*Polianthes tuberosa*. L.) varieties in Taiwan, causing mild mosaic symptoms on the leaves and flower stems. In this study two serological techniques, i.e. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and direct tissue blotting (DTB), were compared for their sensitivity in the detection of TMMV from tuberose leaves and bulbs. ELISA was more sensitive than DTB in indexing tuberose leaves, as evidenced from the results that 94 out of 100 leaf samples were found as positive by the former, while only 89 samples were detected by the latter. However, when the tuberose bulbs were indexed, the sensitivity of DTB was considerably higher than that of ELISA. The former positively detected all of the infected bulbs, while the latter only detected 81% of the bulb samples. The possibility for the higher sensitivity to detect infected bulbs by DTB than ELISA was discussed. Based on tuberose grower's usual practice, bulbs served as planting material should be stored at 5 °C as soon as they were selected. However, concentration of TMMV in bulb tissues was found quickly decreased. After 6 months, only 33% of the infected bulbs could be successfully detected by ELISA as compared to 100% detection before storage. However, all the stored bulbs in this experiment were detected as positive by DTB. When the stored bulbs were removed from 5 °C and incubated at 25 °C for 2 days, TMMV in the bulb tissue enhanced to a concentration level readily detectable by ELISA. Based on these results, we recommend that DTB can be used in combination with 25 °C enhancement treatment as a model protocol for the routine indexing of tuberose bulbs. This protocol should also be useful in the plant quarantine process required when virus-free tuberose bulbs are to produce or export.

Key words : tuberose, tuberose mild mosaic potyvirus, temperature treatment, virus indexing, direct tissue blotting