

夜來香病毒之研究與檢定技術發展現況

張清安^{1,2} 陳金枝¹

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. 聯絡作者：電子郵件cachang@msl.hinet.net；傳真04-3331089
- 接受日期：中華民國 88 年 9 月 30 日

摘 要

張清安、陳金枝. 1999. 夜來香病毒之研究與檢定技術發展現況. 植病會刊8:89-94.

夜來香，又名晚香玉，雖原產於墨西哥，但頗能適應台灣之風土氣候，被視為具發展潛力之近本土化球根花卉。文獻上有關夜來香病毒病之記載甚少，過去僅紐西蘭曾報導有馬鈴薯 Y 屬病毒感染之情形，但並未鑑定出確實之病毒種類。本研究室於 1994 年自夜來香植株中分離出一種長絲狀病毒，經鑑定後證實為一 *Potyvirus* 屬之新紀錄病毒。調查發現本省絕大多數無性繁殖之重瓣品系夜來香均已感染此病毒，由於病株之葉片及花軸上會出現輕微嵌紋病徵，因此將其命名為夜來香微嵌紋病毒 (Tuberose mild mosaic potyvirus, 簡稱 TMMV)。TMMV 除感染夜來香外並未發現有其他寄主植物。除機械傷口接觸外其亦可經由蚜蟲以非永續型方式傳播。以電泳分析估計 TMMV 之鞘蛋白分子量約為 38 kDa。血清試驗結果發現 TMMV 與其他 22 種已知之 *potyviruses* 均不具同源之血緣關係，顯示 TMMV 應為一具獨立分類地位之 *Potyvirus* 屬病毒。此項結論後經進一步選殖及定序 TMMV RNA 之 3' 端約 2 kb 核酸序列並與其他已知之 16 種 *potyviruses* 之核酸與氨基酸序列比對後更加確定。所製備之 TMMV 抗血清可以應用於 ELISA、direct tissue blotting (DTB) 及 SDS-immunodiffusion test 等三種方法將 TMMV 由感病植物組織中專一性檢出。但檢定對象如果是生長中之植株時三者中以 ELISA 最為適用，若對象為儲藏球根時則以 DTB 最佳，而 SDS-immunodiffusion test 則較適用於病毒種類之確認。由於發現 TMMV 在夜來香植株全身部位之濃度分佈頗不均勻，其中以幼嫩新葉及花軸鞘葉之病毒濃度較高，故可作為檢定時之最佳採樣部位，而檢定儲藏期球根時則應以鱗葉為取樣標的，其病毒檢出率之準確度最高。試驗中更發現利用 25 回溫處理長期冷藏於 5 之種球，可促使病毒濃度於二天內迅速提升，增加病毒檢定之正確性。

緒 言

夜來香 (*Polianthes tuberosa* L.)，又名晚香玉，屬龍舌蘭科，原產於墨西哥，三百年前引入台灣後由於頗能適應本地風土氣候已逐漸形成本土化球根花卉^(8, 12, 13)。近年來由於學術單位針對其生長特性開發出多項適合產業化栽培之技術，因此被認為未來極具發展外銷潛力之觀賞作物⁽¹³⁾。目前其切花除供應本省市場消費外，亦有少量外銷日本，最近幾年國外對我開發之促成栽培化種球極有興趣，訂單逐步增加中。

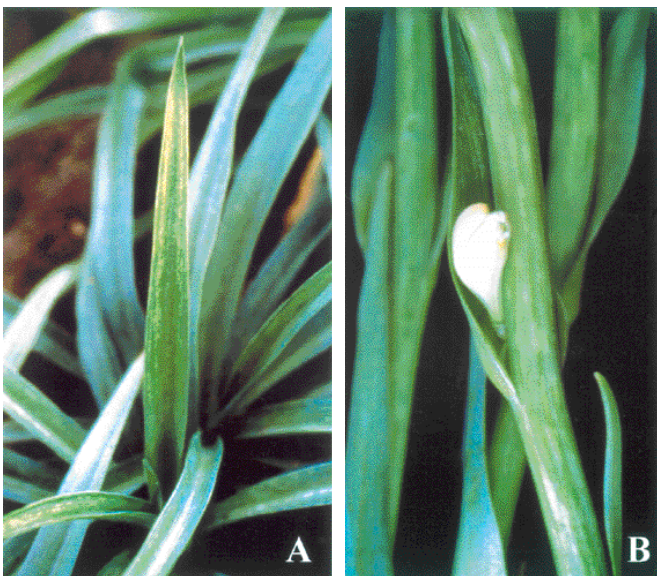
由於夜來香本身之強健自古以來其栽培頗為粗放，國內外有關其病害之記錄不多，近年來在本省較受農民注意的是旱地連作所產生的根瘤線蟲問題，葉部病害如葉斑病等雖然常見，但對生產並不構成威脅⁽⁸⁾。至於病毒病害發生之資料亦相當缺乏，僅紐西蘭學者 Person & Horner 於 1988 年曾報導有類似馬鈴薯 Y 屬 (*Potyvirus*) 之病毒發生

⁽¹¹⁾，然而彼等當時僅記載該病毒之顆粒型態及電顯超薄切片觀察發現風車狀內含體 (pinwheel inclusion) 之結果，至於病毒純化工作則未獲成功，因此有關該病毒之抗血清製備、血清特性、分類地位及其他基本特性並無確定之結論⁽¹¹⁾。筆者等於民國 83 年起與嘉義技術學院植物保護科接受農委會委託與經費補助，著手進行本省夜來香病害之全面調查，當時即發現本省栽培之切花用重瓣夜來香品系幾乎全面出現病毒性病徵，至於供抽取香精用之單瓣品系出現病徵之比例雖然較低，但也有極高之比率呈現相同之癥狀⁽²⁾。因此筆者即開始進行該可能病毒病之診斷鑑定工作，並確定夜來香上至少存在一種 *potyvirus* 之感染，且經接種試驗確定其對夜來香之病原性⁽³⁾，後續之試驗中並成功將此病毒純化及製備抗血清，經與二十二種已知之 *potyviruses* 進行血清比對及鑑定結果，證實此感染夜來香之 *potyvirus* 具有獨特的血清特性，應為一新紀錄的 *Potyvirus* 屬病毒，乃依其所引起之病徵命名為夜來香微嵌

紋病毒 (tuberose mild mosaic potyvirus), 簡稱TMMV⁽⁸⁾。爾後筆者進一步利用分子生物技術將TMMV之鞘蛋白基因及3'端非轉譯區 (non-translated region) 之核酸片段加以選殖, 並予以定序分析比對, 確定TMMV之核酸層次之獨特性, 至此TMMV乃一新記錄之potyvirus終於獲得完整之確認⁽⁶⁾。其後本筆者針對田間病毒調查及種球檢查之需要, 逐步開發出適合各種狀況使用之專一性偵測檢定技術, 並經反覆測試結果確定標準採樣及檢查流程^(4, 7, 10)。本文乃依序介紹本省夜來香病毒TMMV自發現至完成完整鑑定之經過, 彙整各項基本病毒特性之證據, 另外也將研究過程中所建立之各項標準檢定流程簡要說明, 希望有助於增進產官學各界對TMMV之特性與偵測檢定法之瞭解, 提供未來解決此病毒問題之參考。

夜來香微嵌紋病毒發生之調查與鑑定

民國82年起筆者針對本省夜來香主要產地嘉義及屏東地區之夜來香植株進行調查, 發現除部分單瓣夜來香品系之實生植株不具病毒病徵外, 絕大多數無性繁殖之重瓣品系葉片皆普遍出現嵌紋或黃色條斑等類似病毒感染之病徵 (圖一)^(2, 3)。病徵於冬季夜來香生長緩慢時較為明顯, 而夏季植株生長旺盛時則趨於緩和⁽⁹⁾。病株抽花後之花軸表面亦可發現有明顯之條紋病徵 (圖一)⁽⁹⁾。此等植株經內含體染色法於光學顯微鏡下觀察可於細胞質中發現有類似馬鈴薯Y屬 (*Potyvirus*) 病毒所引起之束狀 (bundle shaped) 內



圖一、夜來香微嵌紋病毒 (tuberose mild mosaic potyvirus) 於夜來香葉片 (A) 及花軸 (B) 上所表現之嵌紋與條紋病徵。

Fig. 1. Mild mosaic and stripe symptoms developed by tuberose mild mosaic potyvirus on tuberose leaves (A) and peduncles (B).

含體 (inclusions)⁽⁹⁾。利用電子顯微鏡觀察其陰染之葉滴 (leaf dip), 亦可發現有類似馬鈴薯Y屬 (*Potyvirus*) 病毒之長絲狀病毒顆粒 (flexuous rod-shaped particle), 其長度範圍約在700 ~ 800 nm之間⁽⁹⁾。若以電子顯微鏡觀察病組織之超薄切片, 可發現典型potyviruses所引起之風車狀圓柱內含體 (pinwheel cylindrical inclusion) 存在於細胞質中⁽⁹⁾。以機械接種法 (mechanical inoculation) 可以將夜來香病株葉片成功接種於單瓣品系之夜來香實生苗上, 並產生與田間病株相同之病徵⁽⁹⁾。利用桃蚜 (*Myzus persicae* Sulzer) 以非永續型方式 (non-persistent type transmission) 可成功將此病毒傳播至夜來香實生苗⁽⁹⁾。上述結果顯示, 本省夜來香植株所發現之長絲狀病毒極可能為一種 *Potyvirus* 屬病毒。事實上爾後筆者根據一株對應 *Potyvirus* 屬病毒之專一性單元抗體 (potyvirus-specific monoclonal antibody, Agdia Inc., Elkhart, IN) 與夜來香病株獲得強烈正反應之結果, 證實該病毒確為一種potyvirus⁽⁹⁾。

後續之接種試驗發現無法將此夜來香病毒傳接至紅藜等16種植物上, 顯示此病毒之寄主範圍十分狹窄, 可能僅感染夜來香⁽⁹⁾。利用高低速交替離心 (differential centrifugation) 及硫酸銨等密度平衡離心法 (CsSO_4 equilibrium centrifugation) 可成功自夜來香葉片純化出一種長絲狀病毒, 經電子顯微鏡觀察其長度平均約為 750 nm, 此純化試料與上述之 potyvirus-specific monoclonal antibody 亦產生強烈之免疫反應⁽⁹⁾。電泳分析此純化試料發現此病毒之鞘蛋白僅由單一基本單位 (subunit protein) 所構成, 其分子量估計為 38 kDa, 亦符合 *Potyvirus* 屬病毒之特性範圍, 而由健康無病毒感染之實生苗經過相同純化步驟所得試料中並無發現此蛋白存在⁽⁹⁾。以上證據均一再證明本省夜來香上所發現之長絲狀病毒確屬一種馬鈴薯 Y 屬病毒, 因此根據其病徵特性將其命名為夜來香微嵌紋病毒 (tuberose mild mosaic potyvirus), 簡稱TMMV⁽⁹⁾。接著將純化之病毒注射於家兔, 順利取得對應TMMV之專一性抗體, 根據後續所進行之多項血清試驗發現TMMV與其他22種已知之potyviruses均不具同源之血緣關係, 再度顯示TMMV應為一具獨立分類地位之新*Potyvirus*屬病毒⁽⁹⁾。

夜來香微嵌紋病毒分類地位之確定

為證明TMMV確為一新記錄之*Potyvirus*屬病毒, 筆者嘗試應用分子生物技術進行研究, 希望除了傳統之血清類緣比對證據外, 再提出核酸層次之比對證據, 以進一步證明其分類地位之獨特性。試驗中利用前人已報告對 potyviral RNA 之3'端核糖酸序列具廣效性之引子對 (degenerate primers)⁽¹⁵⁾, 進行反轉錄—聚合酶連鎖反應 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 將TMMV RNA 3'端涵蓋全長鞘蛋白基因之序列加以增幅放大, 結果獲得一分子量大小約 2.0 kb 之核酸片段⁽⁶⁾。其

後將此核酸片段選殖於pCR II載體 (Invitrogen, San Diego, CA) 上, 再利用非放射性標識定序法 (non-isotopic sequencing method) 分析其核甘酸序列, 共解得1934個核甘酸序列之片段⁽⁶⁾。此序列經CLUSTAL V program比對分析後發現, 只含有一個轉譯架構 (open reading frame) 對應產生一個含有599個氨基酸之複合蛋白 (polyprotein)。此片段之第一個終止碼 (stop codon) 位於第1804 ~ 1806個核甘酸之位置上, 其下游為一含133個核甘酸之非轉譯區 (non-coding region, NCR) 及poly (A) 尾端⁽⁶⁾。分析結果發現TMMV之鞘蛋白基因 (CP gene) 共含有280個氨基酸, 其上游之核內含體b基因 (nuclear inclusion b, NIb) 與CP gene間之切位乃位於氨基酸序列Q與S之間, 此特性與Potyvirus屬病毒完全符合⁽⁶⁾。由CP之N端算起第19 ~ 21個氨基酸之位置上, 發現有代表蚜蟲傳播能力訊息之DAG triplet, 顯示TMMV確實具有可藉由蚜蟲傳播之能力⁽⁶⁾。將所解得之TMMV RNA 3' 端序列與BYMV等16種已知之Potyvirus屬病毒核甘酸序列比對後發現, TMMV與彼等病毒之NIb、CP及NCR等部位之相同度 (homology) 均低於60% (表一), 此結果證明TMMV確實具有獨特之核酸序列特性, 應為一尚未記錄之新種 (species) Potyvirus屬病毒, 同時也印證先前根據血清類緣比對結果所下結論之正確性⁽⁶⁾。

TMMV抗體之製作與檢定技術之開發

先前提及TMMV早在1988年即由紐西蘭學者發現, 但由於當時無法獲得純化之病毒, 故未能製備出TMMV之專一性抗體⁽¹¹⁾, 顯示此病毒之純化具相當高之困難度, 而為此病毒抗體製備成功與否之關鍵所在。事實上筆者在研究過程中也遭遇同樣的困難, 初期的純化試驗中均未獲得任何結果, 爾後由於改變夜來香材料之準備方式, 終於獲得足量之純化TMMV病毒顆粒, 因而完成了國際記錄上第一個對應TMMV之專一性抗體之製作⁽⁹⁾。利用此抗體已針對TMMV病毒之特性發展出適用之免疫偵測法, 包括專供檢定大量標本之酶聯抗體法 (ELISA) 及採樣較為迅速簡便之組織轉漬法 (direct tissue blotting, DTB), 另外也適用於可迅速判別病毒親緣關係之免疫擴散法 (SDS-immunodiffusion test)^(4, 7, 9, 10)。除免疫偵測法外, 亦發展出RT-PCR檢測法⁽⁹⁾, 其敏感度優於免疫偵測法, 唯成本與技術門檻較高, 未來可應用於重要特殊品種之原原種種球之病毒檢定。

TMMV在夜來香植株內之分佈及其對病毒檢測之影響

為瞭解TMMV在夜來香植株不同部位組織內濃度之差異, 以作為進行病毒檢定工作時決定採樣最適部位之依據, 筆者利用前述所發展之ELISA檢定技術, 就夜來香不同部位組織內所含TMMV濃度進行比較。由於夜來香之葉片細長線形, 自球根頂端抽生, 花軸由葉叢中抽出, 花蕾

表一、夜來香微嵌紋病毒 (tuberose mild mosaic potyvirus) 之鞘蛋白基因與3' 端非轉譯區之核甘酸序列及氨基酸序列與16種馬鈴薯Y屬病毒之相同區域間之相同度

Table 1. Percent nucleotide identity of coat protein and 3' non-coding region of TMMV and 16 other potyviruses.

Potyviruses ^a	Percent identity (%)		
	CP gene		3'-NCR
	nt	aa	nt
BYMV	54.5	49.1	33.3
LMV	61.3	52.4	3.6
LYSV	58.5	55.1	12.3
PMtV	57.2	55.0	2.8
PPV	51.2	48.5	33.3
PRSV	55.4	49.2	0.9
PSbMV	30.8	51.0	0.0
PSMV	59.3	55.6	0.0
PVY	60.4	57.7	21.6
SMV	53.5	48.1	3.1
TEV	59.6	55.6	38.6
TuMV	57.3	55.4	36.9
TVBMV	25.5	52.6	0.0
WMV2	59.1	55.7	28.2
YaMV	53.7	49.4	36.3
ZYMV	60.8	57.0	3.3

^a BYMV = bean yellow mosaic virus, LMV = lettuce mosaic virus, LYSV = leak yellow stripe virus, PMtV = pepper mottle virus, PPV = plum pox virus, PRSV = papaya ringspot virus, PSbMV = pea seedborne mosaic virus, PSMV = pepper severe mosaic virus, PVY = potato virus Y, SMV = sugarcane mosaic virus, TEV = tobacco etch virus, TuMV = turnip mosaic virus, TVBMV = tobacco vein banding mosaic virus, WMV2 = watermelon mosaic virus 2, YaMV = yam mosaic virus, ZYMV = zucchini yellow mosaic virus.

則著生在花軸上端, 花朵成對依序往上開放。因此採取夜來香之花朵、花軸、花軸鞘葉、葉片 (不同葉齡分別比較)、種球及根部等組織以等量之緩衝液進行研磨後取得相同稀釋濃度之汁液, 再以ELISA檢測其內所含病毒, 根據反應後之吸光度大小, 作為評估病毒濃度高低之指標。結果發現TMMV之濃度以花軸鞘葉, 花軸表皮組織及新葉等部位較高。其中濃度最高的是花軸鞘葉, 其EIA反應值約為最低的老葉之十倍以上⁽⁵⁾。比較不同葉齡之葉片則發現, 內層新生葉片之病毒濃度最高, 外層老葉者則逐漸遞減⁽⁵⁾。在不同大小之花軸鞘葉中, 花軸近頂端之幼嫩鞘葉組織內病毒含量較低, 而靠近花軸基部較成熟之鞘葉則濃度較高⁽⁵⁾。因此當進行田間植株之病毒調查時, 若植株尚未抽生花軸, 則內層之新生葉片應屬最佳之採樣檢測部位, 而當植株已抽生花軸時, 則可考慮採取花軸基部之鞘葉作為檢測之標本, 則所得之結果準確度較高⁽⁵⁾。

另一試驗發現TMMV在葉片中之濃度高低受外在環境

溫度之影響，若將植株栽培於18、25及30 三種不同溫度下，夜來香體內病毒濃度隨生長期之增長而逐漸遞減，其中尤以30 之生長溫度下，其病毒濃度之遞減最快，故其濃度較前二者低⁽⁵⁾。不同成熟度花朵之花瓣組織內病毒濃度以飽滿成熟顏色轉白者較高，而未成熟之花朵其花瓣顏色仍為青綠色者，病毒含量則較低⁽⁵⁾。此外TMMV在夜來香球根上之分布亦不均勻，比較側芽，鱗葉及基盤三部位之組織後發現，側芽及鱗葉之病毒濃度較高，其病毒檢出率約為檢查基盤組織之三倍。故若以球根為檢測對象時，應選擇前二者為取樣標的，其結果之準確度及可信度較高⁽⁵⁾。試驗發現取樣時若將每一球根取一側芽提升至取三個側芽時，其病毒檢出率可由93%提升至100%⁽⁵⁾。其次亦發現利用溫度處理具有明顯提升偵測帶毒球根準確度之效果。由於夜來香之種球一般均儲藏於5 下，儲藏期間種球內病毒濃度會逐漸下降至不易被準確測出之程度，但是若將此長期冷藏之種球取出，靜置在25或30 下回溫處理2天，即可刺激病毒濃度迅速提升，可輕易於側芽處測得高濃度之TMMV；但若以18 回溫處理，則須至少四天方可將病毒檢測出來^(4, 7, 10)。以上結果可作為檢測田間夜來香植株或儲藏種球時決定最佳採樣部位之參考。

TMMV標準化檢查流程之建立

比較前述所開發之幾種免疫偵測法包括ELISA、DTB及點漬法(dot blotting, DT) 應用於檢定TMMV時之適用性，以作為決定標準檢查流程之參考。試驗結果發現應用DT 法偵測TMMV時，以0.05 M磷酸鉀緩衝液(pH 7.5) 作為組織之萃取溶液，配合50~70 ul之覆膜量(coating solution) 可達到理想之病毒檢出率，但是當比較其與ELISA間之偵測敏感度時，發現雖然二者間並無差別，但因ELISA之判讀結果可數據化，尤其當組織中病毒濃度偏低時可依反應吸光值(EIA value) 之高低與健康對照反應之背景值比較，決定出正反應標準，故在實用上較單用肉眼判別正負反應之DT法客觀^(4, 7, 10)。因此建議以ELISA作為例行檢定夜來香植株之標準方法^(4, 7, 10)。

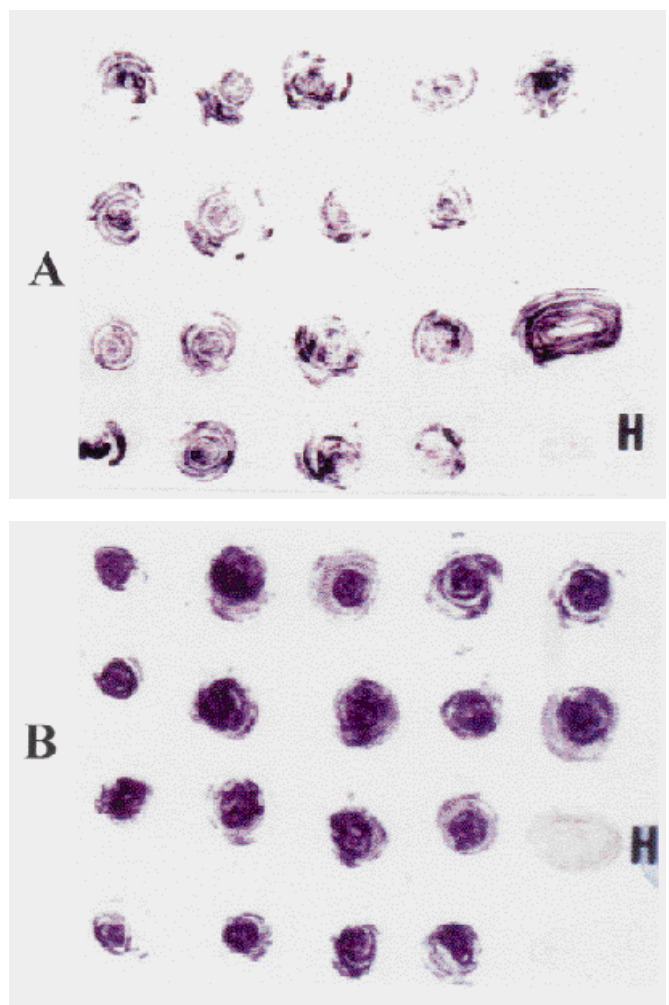
另外在研究比較ELISA與DTB之實用性時發現，當樣品中病毒濃度高時，DTB與ELISA檢測所得之病毒檢出率並無差異。但是當樣品中病毒濃度偏低時，葉片樣品以ELISA檢測所得之病毒檢出率較DTB之結果高，此現象應與ELISA結果可以數據化而較容易判斷有關；不過當檢定對象為種球時，縱使病毒濃度低於ELISA檢出範圍，DTB法仍可獲得較高之病毒檢出率，此現象可能與病毒在夜來香種球頂端鱗葉中傾向於累積在特定位置，其結果容易判別有關⁽⁷⁾。若進一步將冷藏種球以25 回溫處理2天再進行檢定，則更有助於結果之判斷，而增加檢出病毒之正確性⁽⁷⁾(圖二)。研發過程發現應用DTB在檢定夜來香種球時，其取樣及反應程序均比其他二種檢定法方便而省時，極適合應用於大量夜來香種球之病毒篩檢，未來此技術可

作為夜來香無病毒種球生產或進出口種球檢疫認證時之標準檢查程序^(4, 9)。

綜合以上各項結果，建議在面對不同夜來香樣品時，應選擇適合之檢定方法，才能獲得正確之檢定結果，例如面對田間植株葉片樣品時，應選用ELISA較佳，若樣品為種球時，則以DTB為最佳之選擇⁽⁷⁾。

應用分子生物技術突破病毒純化瓶頸改進 TMMV 抗體生產效率

傳統病毒抗體之製備，一向以純化之病毒顆粒或經電泳回收之鞘蛋白作為免疫原，注射於動物體內刺激其產生



圖二、應用組織轉漬法偵測長期4 冷藏(A)及25 回溫處理二天之夜來香種球(B)之結果。

Fig. 2. Result of direct tissue blotting method to index tuberose mild mosaic potyvirus (TMMV) from dissected tuberose apical bulb leaf tissue. (A) Indexing result of tuberose bulbs stored at 4 refrigerator for at least 4 months before indexing. (B) Indexing result of the same tuberose bulbs as in (A) but incubated at 25 for 2 days before processing direct tissue blotting test for TMMV.

免疫反應後取得，因此抗體品質之優劣決定於所注射之免疫原的純度。然而對於不易純化之病毒種類，例如大多數感染花卉之病毒，常因此影響抗血清之製備。為克服此困難，學界曾試圖以核酸偵測技術取代傳統之血清檢定，然而檢定核酸過程中樣品之準備較為繁鎖，且材料及藥劑價格高昂，尚難普及應用於產業界大量樣品之篩檢工作。近年來分子生物技術之突破，避開病毒純化之困難而製備出合乎檢定需求之高專一性優質抗體已成為可能。事實上 TMMV 就是一個典型寄生範圍狹窄，無其他代用寄主，且於夜來香組織內濃度偏低而純化不易之病毒。本研究雖然已克服傳統純化程序之障礙，獲得純化之 TMMV 病毒，且製備出可用之專一性抗體，惟基於所獲得之抗體有限，必不符未來產業之需求，因此如何能突破病毒純化之瓶頸，改進 TMMV 抗體生產效率，當為刻不容緩之急務。

因此筆者以純化之 TMMV RNA 為模版，利用 Zerbini (1996) 所設計之 potyvirus 3' - end degenerate primers 進行 RT-PCR 反應⁽¹⁴⁾，增幅後獲得一分子量大小約 2.0 kb 之核酸片段。此片段經選殖於 pCR II 載體上再以核酸自動解析儀進行解序，共解得含 1934 個核甘酸之序列。此序列涵蓋全長度之鞘蛋白 (CP) 與部分之核內含體 b 蛋白 (NIb) 基因，TMMV 之 CP gene 共含有 280 個氨基酸。利用此核甘酸序列設計出一組可對應全長度 TMMV CP gene 之專一性引子對⁽⁶⁾，以純化之 TMMV RNA 為模版進行 RT-PCR 反應，將所增幅放大之 CP 基因片段選殖於表達載體 pET-30b (Novagen) 上，繼而轉型於 *E. coli* BL 21 宿主內，經 IPTG 誘導後可產生含部份細菌蛋白之融合性蛋白 (fusion protein)⁽⁶⁾，此蛋白經西方轉漬法 (Western blot) 分析，發現確實能與 TMMV 抗血清產生專一性反應，且於 SDS-免疫擴散反應中與 TMMV 抗原產生同源性反應 (identical reaction)，此結果證明由細菌所誘發之表現蛋白確實含有 TMMV 之 CP 基因產物⁽⁶⁾。將此含有 TMMV 鞘蛋白嵌入序列之細菌菌株大量培養於液體培養基，將菌體回收利用超音波震脆，取得其全量蛋白試料 (total protein fraction)，再利用吸附性色層分析法 (affinity column chromatography) 將含有 TMMV CP 之融合蛋白予以回收純化。透過傳統之免疫注射程序，已成功生產出對應此融合蛋白之專一性抗體，並經證實其反應性與傳統 TMMV 抗體無異，甚至發現其與健康對照夜來香抗原之反應背景值比傳統抗體更低，更具應用之價值⁽⁶⁾。上述結果顯示不僅 TMMV 病毒不易純化，導致抗體不易製備之瓶頸已經透過生物技術方法被順利克服，甚至由於所製備之抗體反應品質之提升與持續供應之可能，未來我國針對夜來香 TMMV 病毒之檢定將可永續經營，而此項突破使我國在夜來香產業之發展上將更具競爭優勢。

結 論

以上有關夜來香病毒之檢定技術與所生產之抗體試劑不僅可供我國發展夜來香健康種球生產之用，而且可供進出口檢疫之技術支援。由於目前我國乃世界上具有夜來香栽培產業之國家中，唯一掌握夜來香之病毒特性、純化及檢定方法者，更由於目前也只有我國製備出對應夜來香病毒之抗體試劑，加上應用生物技術已解決該病毒不易純化之瓶頸，未來此病毒之抗體試劑將源源不斷供應國內所需，此將使我國在夜來香產業之發展上更穩居技術領先地位。未來國內夜來香產業若能進一步改進育種技術，使品種能夠更加多樣化，則此產業之永續蓬勃發展勢必水到渠成。由於掌握了夜來香病毒之檢定方法，筆者最近已成功利用生長點組織培養法，獲得了無病毒夜來香植株，經過初步調查其生長確實比帶病毒植株更加強健快速，至於是否病毒感染會影響夜來香切花之產量與品質，仍有待持續之調查，不過近期內即會有確切之結論，屆時再將成果分享產學各界，希望有助於我國夜來香產業之發展。

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，謹此致謝。研究過程中蒙嘉義技術學院園藝科沈再木、黃達雄、黃光亮及杜柏勳老師，植保科童伯開及鄭明發老師等協助田間調查、提供材料與分享研究經驗心得，虎尾農會推廣股及各級人員多方協助使本研究得以順利完成階段性成果，在此一併表達由衷謝意。

引用文獻

1. 張清安、陳金枝 1996. 球根花卉病毒及預防。p. 160-173. 球根花卉產業研討會專刊。農林廳種苗改良繁殖場編印。280 pp.
2. 陳金枝、張清安 1994. 夜來香病毒之初步研究。植物病理學會刊 3:245.
3. 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。植物保護學會刊 37(4):446.
4. 陳金枝、江芬蘭、張清安 1997. 夜來香微嵌紋病毒血清檢定法之研究與應用。植物保護學會刊 39:397.
5. 陳金枝、江芬蘭、張清安 1998. 夜來香微嵌紋病毒在植株內之分布及其對病毒檢測之影響。植物保護學會刊 40:199-207.
6. 陳金枝、張清安、江芬蘭、劉逸琪、向培健 1998. 夜來香微嵌紋病毒鞘蛋白基因核甘酸序列分析及其在 *Escherichia coli* 之表現。植物病理學會刊 7:226.
7. 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。植物病理學會刊 8: (in press)

8. Benschop, M. 1993. Polianthes. p. 589-601. In: The Physiology of Flower Bulbs. De Hertogh, A., and Le Nard, M. ed. Elsevier, Amsterdam, 811 pp.
9. Chen, C. C., and Chang, C. A. 1998. Characterization of a potyvirus causing mild mosaic on tuberose. Plant Dis. 82:45-49.
10. Chen, C. C., Chang, C. A., and Chiang, F. L. 1996. Development of indexing techniques for tuberose mild mosaic virus. Plant Pathol. Bull. 5:221.
11. Horner, M. B., and Person, M. N. 1988. Purification and electron microscopy studies of a probable potyvirus from *Polianthes tuberosa* L. Journal of Phytopathology 122:261-266.
12. Huang, S. J. 1981. Study of dry heat bulb treatment on promotion of *Polianthes tuberosa* L. MS. Thesis. Research Institute of Horticulture, National Chung-Hsing University. 61 pp.
13. Shen, T. M., Huang, T. S., Du, B. S., and Huang, K. L. 1993. Breeding of tuberose for cut flower. Journal of Chinese Society for Horticultural Science. Vol. 39(1):23-29.
14. Zerbini, f. M., Koike, S. T., and Gilbertson, R. L. 1995. Biological and molecular characterization of lettuce mosaic potyvirus isolates from the Salinas Valley of California. Phytopathology 85:726-752.

ABSTRACT

Chang, C. A. ^{1,2} and Chen, C. C. ¹ 1999. Current status of tuberose virus research and the development of its indexing techniques. Plant Pathol. Bull. 8:89-94. (¹ Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wu-Feng, Taichung 413, Taiwan, R.O.C., ² Corresponding author: E-mail: cachang@ms1.hinet.net; Fax: 04-3331089)

Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.), a species native to Mexico, has been cultivated in Taiwan for over 300 years and has become an economically important bulb crop. Several diseases including *Erwinia* spp., *Botrytis* spp., and *Sclerotium rolfsii* have been documented to infect tuberoses, however, there has not been any report on virus disease until 1988 when a virus, possibly a potyvirus, was described in New Zealand. During a survey for ornamental plant virus diseases in 1994, foliar mild mosaic symptoms were noticed on most tuberose plants in Taiwan. A virus was isolated from infected plants and it was subsequently identified as an newly recognized potyvirus, designated as tuberose mild mosaic potyvirus (TMMV), based on particle morphology, aphid transmissibility and the cylindrical inclusions it induced in infected cells. Tuberose was the only host identified so far for TMMV in our inoculation experiment. The purified capsid contained a single species of protein monomer with an estimated relative mass of 38 kDa. Based on the result of several serological tests, TMMV was found serologically distinct to other 22 known potyviruses tested. This was further confirmed by the comparative sequencing studies of a 2 kb DNA fragment cloned from the 3' terminus of TMMV's RNA. Using the antiserum prepared against purified TMMV virions, we showed that ELISA, tissue blotting and SDS-immunodiffusion test could specifically detect the virus from tuberose tissue. Among them, ELISA was found the most appropriate one for detecting virus infection in leaf tissue, however, tissue blotting was evaluated as the best choice for bulb indexing. TMMV was found distributed unevenly in different parts of tuberose plants. The highest concentration was detected in sheath leaves of flower stems followed by the young leaves; they were reasonably taken as the best sampling sites during field survey. To index tuberose bulbs, however, lateral buds and apex scale leaves were optimum choices for sampling. It was also found that by treating the 4 -stored bulbs at 25 for 2 days could enhance virus multiplication in bulb tissue from a minimum to a detectable level thus allowing better and consistent indexing. An antiserum against bacteria expressed cloned TMMV coat protein has been successfully produced and shown that it was applicable, equivalent to the antibodies produced by traditional means, in the detection of TMMV in tuberoses.