

百合 *Plantago asiatica mosaic virus* 檢測試劑製備與提升 病毒檢出率之血清檢定法研發

陳金枝^{1,*} 張郁靈² 林碧雲² 江芬蘭² 鄭櫻慧³ 鄧汀欽⁴

摘要

陳金枝、張郁靈、林碧雲、江芬蘭、鄭櫻慧、鄧汀欽。2013。百合 *Plantago asiatica mosaic virus* 檢測試劑製備與提升病毒檢出率之血清檢定法研發。台灣農業研究 62(3):268–279。

2011年初於國外進口之百合種球首次以核酸檢測法檢出一種屬於 *Potexvirus* 之病毒核酸片段，由核酸序列鑑定確認其為國外已報告之車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV)。進一步依據 GenBank 上已登錄之 PIAMV 核酸序列，設計可增幅全長度鞘蛋白基因序列之引子對 PIAMV-cpup (5'-CCGCGGCCGCCACACTACTC) 及 PIAMV-cpdw (5'-GGCCCCACCAGACTTTTACT)，針對進口百合種球之罹病組織 (代號 LV1) 之全量核酸進行 RT-PCR 檢測，可增幅出預估 933 bp 之核酸片段產物，此核酸片段進一步選殖與定序結果，證實其帶有 PIAMV 之全長度鞘蛋白基因，且與 GenBank 上已登錄之 PIAMV 病毒 (accession no. AB360794.1) 之鞘蛋白胺基酸序列相同度高達 93% 以上。利用細菌表現蛋白系統所生成之 PIAMV-LV1 鞘蛋白作為抗原進行抗血清製備，所製備出之 PIAMV-LV1 多元抗體可成功應用於 Indirect ELISA (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay) 及西方轉漬法 (western blotting) 等血清檢定法而專一性地檢出此病毒，並發現以直接組織轉漬法 (direct tissue blotting; DTB) 於植株不同部位組織上對此百合病毒的檢出率均顯著高於用 ELISA 檢測的結果；植株地下部之病毒檢出率，由根系檢出者顯著地高於由種球鱗片檢出者。運用 PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw 引子對，可應用於不同品系百合的 PIAMV CP 之 RT-PCR 檢測。由上述結果顯示，本研究所開發之 PIAMV 血清與核酸檢測試劑，可應用於百合之 PIAMV 檢定，尤其 DTB 法為一種可有效地提升百合檢出 PIAMV 的血清檢定方式。

關鍵詞：百合病毒病、車前草嵌紋病毒、血清製備、直接組織轉漬法、RT-PCR 檢測。

前言

百合為本省具經濟重要性之球根花卉，目前所栽培之種球絕大多數均由國外進口，百合栽培過程中受病毒感染而影響切花品質。記錄上共有十餘種病毒可危害百合，目前國內已鑑定可感染百合之病毒包括百合斑紋病毒 (*Lily mottle virus*; LiMV) (Derks 1995; Zheng *et al.* 2003)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic*

virus; CMV) (Derks 1995)、百合隱微型病毒 (*Lily symptomless virus*; LSV)、百合 X 病毒 (*Lily virus X*; LVX) (Memelink *et al.* 1990) 及草莓潛隱輪斑病毒 (*Strawberry latent ringspot virus*; SLRSV) (Cohen *et al.* 1995; Chang *et al.* 2001) 等。

車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV)，為 *Potexvirus* 屬病毒成員，病毒顆粒呈絲狀，長度約 490–530 nm，

投稿日期：2013 年 5 月 17 日；接受日期：2013 年 8 月 7 日。

* 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。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。

鞘蛋白分子量約為 22 kDa (Solovyev *et al.* 1994; Komatsu *et al.* 2008)。PIAMV 首次於 1976 年在前蘇聯之車前草 (*Plantago asiatica*) 上發現，主要藉由機械性傷口及種苗帶毒而傳播 (Komatsu *et al.* 2008)。PIAMV 主要分布在中亞地區，近年來於世界各地陸續有不同寄主被報導有此病毒的發生，包括蘇聯、日本、美國及荷蘭等。PIAMV 寄主範圍廣，包括美國之小蘗科南天竹 (*Nandina domestica*) (Hughes *et al.* 2005)；日本之歐洲櫻草 (*Yamashita et al.* 2003)、百合屬之胭脂花及天女報春花 (*Primula sieboldii*) (Komatsu *et al.* 2008)。人工接種之寄主包括奎葵 (*Chenopodium quinoa* Willd.)、紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、煙草 (*Nicotiana benthamiana* & *Nicotiana occidentalis*)、千日紅 (*Gomphrea globosa*)、菠菜 (*Spinacea oleracea*)、番杏 (*Tetragonia expansa*) 等 (Hughes *et al.* 2005; Ozeki *et al.* 2006)，其他寄主則尚未定論。

2003 年間，由日本學者首次證實 PIAMV 可感染百合 (Takeuchi & Sasaki 2003)；荷蘭於 2010 年由其植物保護署 (Protection Service of the Netherlands) 報導指出此病毒引起溫室所種植之百合植株之葉片會出現黃化壞疽型病徵，造成花卉產值下降 (引用自網路資料 http://www.vwa.nl/txmpub/files/?p_file_id=2001424)。根據國外的報告顯示，百合植株被 PIAMV 感染後，造成百合植株葉片呈現壞疽型病徵 (Takeuchi & Sasaki 2003)，嚴重影響植株之生育與開花品質；而在百合上，目前已知此病毒主要經由種球帶毒長途傳播，此途徑使得此病毒容易隨進口種球而有引進國內之風險；若種植帶毒種球後，透過汁液機械傳播方式，於切花採收過程的切離傷口使得剪枝工具上沾有病毒汁液，則病毒會隨連續切花程序而有將病毒傳播於健康植株上的風險。因此防治此病毒之根本策略，乃於百合進口種球上強化對此病毒之檢疫措施，以防堵病毒隨種球而輸入國內，準確而有效率之病毒檢定技術更可早期檢出帶毒種球以因應。

本研究以進口百合種球所檢測到的 PIAMV 病組織為材料，在溫室隔離栽培環境

的觀察下進行試驗。利用病組織之全量核酸為模板，以 RT-PCR 法取得 PIAMV 之病毒鞘蛋白基因進行病毒的分子鑑定，並開發 PIAMV 之核酸檢測技術；利用分子選殖病毒鞘蛋白分子並於細菌生合成系統內進行鞘蛋白的表現，進一步純化表現蛋白作為抗原，以製備對應 PIAMV 病毒之多元抗體；建立能準確檢出病毒的取樣部位與血清檢測方式，提昇對 PIAMV 的檢出效率與檢定準確性，強化對此病毒之檢防疫監測能力。

材料及方法

病毒材料來源及 *Potexvirus* 核酸片段增幅選殖與定序鑑定

本研究於 2011 年由國外進口百合種球 (Gracia 品系) 檢測出疑似病毒感染，代號 LV1，取其罹病組織 0.1 g，以液態氮研磨均勻，利用植物全量核酸純化試劑組 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 進行 RNA 純化。取 LV1 病組織之總量核酸並參考 Miglino *et al.* (2006) 所發表的 *Potexvirus* 屬鑑別用引子對 (Potex 4/Potex 5) 以進行 RT-PCR 反應，反應條件依照試劑組 (GeneMark Co., Taichung, Taiwan) 提供的步驟方法進行：每 50 μ L 反應液中分別加入 2 μ L 之全量核酸 (RNA)、10 μ L 之 5 \times Reaction Mix、10 μ L 之 Enhancer、1 μ L 之 RNase Block、1 μ L 之 Enzyme Mix、各 2.5 μ L 之 Potex 4/Potex 5 引子對及 21 μ L 之 Nuclease-free water。於熱循環反應器中 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT)，設定反應程序為 50 $^{\circ}$ C 下進行反轉錄 30 min，94 $^{\circ}$ C 變性 2 min；之後進行 30 個 PCR 循環：94 $^{\circ}$ C 變性 1 min 30 s，52 $^{\circ}$ C 鍊合 50 s，72 $^{\circ}$ C 聚合 2 min，最後一個循環之 72 $^{\circ}$ C 聚合反應延長 6 min。

反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析。將預估大小約 280 bp 的核酸片段增幅條帶，利用 Micro-Elute DNA Clean Extraction 試劑組 (GeneMark Co., Taichung, Taiwan) 及其建議方法進行純化，並將純化所

得之核酸片段進行定序分析。

PIAMV 核酸分子片段選殖與定序分析鑑定

利用 *Potexvirus* 屬鑑別用引子對 Potex 4/Potex 5 引子對進行 RT-PCR 反應所增幅出之 LV1 罹病百合組織之核酸片段 (280 bp) (結果未顯示)，經定序分析結果顯示其係屬 *Potexvirus* 之 *Plantago asiatica mosaic virus* 核酸部分片段。為進一步釐清病毒分類地位，選用 GenBank 上已登錄之 7 個 PIAMV 分離株的鞘蛋白 (coat protein; CP) 序列 (登錄序號分別為 AB360795.1、AB360794.1、AB360793.1、AB360792.1、AB360791.1、AB360796.1 及 AB360790.1)，針對其全長度鞘蛋白核酸序列兩端之高保留區域設計引子對 PIAMV-cpup (5'-CCGCGGCCGCCACACTACTC) 及 PIAMV-cpdw (5'-GGCCCACCAGACTTTTCACT)。將百合罹病組織 (LV1) 之全量核酸以 PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw 引子對進行 RT-PCR 反應，反應條件如使用 Potex 4/Potex 5 引子對反應所述。反應結果預估可增幅出 933 bp 的核酸片段。取此核酸片段構築於 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) 載體上，進行核酸選殖與定序分析，方法如以往報告所示 (Chiang *et al.* 2011)。

PIAMV 病毒鞘蛋白分子選殖與表現

LV1 鞘蛋白 (CP) 基因定序確認後，由於 PIAMV-LV1 之 CP 基因本身於其 5' 端起始以及近 3' 端的核苷酸序列已分別含有對應 *NcoI* (CCATGG) 以及 *XhoI* (CTCGAG) 限制酵素切位，因此在表現蛋白之構築時乃直接以 *NcoI*/*XhoI* 切取大小僅約 576 bp 之 CP 核酸片段，次選殖於表現載體 pET-28b (+) (Novagen, Inc. Madison, WI, USA) 上，並轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3)。轉型株以 M9 培養基培養 (Li *et al.* 1998)，以 1 mg mL⁻¹ 之 IPTG (isopropyl-β-D- thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質表現 (Chen *et al.* 2002)。IPTG 誘導培養後之菌液以 8,000 rpm 轉速 (Spectrafuge 24D 型, Labnet Inc. NJ, USA) 離心 10 min，取其沉澱物以 0.5 M Tris-EDTA (pH 8.0) 之緩衝液

溶解均勻，並進行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳，以分析表現蛋白之分子量。選用確定有預估大小約 21 kDa 表現蛋白之選殖株進行大量培養與純化表現蛋白，將表現蛋白純化濃縮為 1 mg mL⁻¹ 以作為抗原，並送交濁水溪生物科技有限公司 (桃園，台灣) 進行兔免疫注射製備多元抗體。

PIAMV 多元抗體免疫檢測效果

酵素連結免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)：本研究採用間接酵素連結免疫吸附法 (Indirect ELISA) 進行病毒之 ELISA 檢測。取 0.1 g 之待測組織於研磨袋，加入 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，將組織液加到 ELISA 反應盤內 (100 μL/孔)，放入 37°C 培養箱 3–4 h (或 4°C 隔夜) 進行覆膜反應，之後以 1× PBST 清洗 3 次，每次浸泡 3 min；加入自製之 PIAMV-LV1 抗體 (#184)，放置於 25°C 恆溫箱反應 3–4 h；爾後以 1× PBST 清洗 3 次，每次浸泡 3 min；再加入已稀釋 6,000 倍之山羊抗兔二次抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA) (100 μL/孔)，置於 25°C 恆溫箱反應 3–4 h；最後再以 1× PBST 清洗 3 次，每次浸泡 3 min；加入 1 mg mL⁻¹ 之鹼性磷酸酶基質 (p-NPP, Amresco, Solon Ind., Ohio, USA) (150 μL/孔) 進行呈色反應。以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取波長為 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃度高低之依據 (Clark & Adams 1977)。樣品讀值若大於健康組織讀值 2 倍者，視為正反應。

SDS-免疫擴散反應 (Sodium-dodecyl sulfate immunodiffusion test)：將待測組織研磨均勻，與二次蒸餾水、3% SDS 以等量 (g : mL : mL) 混合均勻，取 400 μL 混合組織液至 1.5 mL 的微量離心管內，於 100°C 熱水中悶煮 3 min，作為 SDS 處理過之抗原，再取製備完成的 PIAMV-LV1 抗血清 (#184) 進行 SDS-免疫擴散反應 (Purcifull & Batchelor 1977)。

西方墨點法 (western blotting)：取 0.1 g

待測組織置於 1.5 mL 微量離心管內，加入液態氮磨碎，加入 200 μ L dissociation buffer (240 mM Tris HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 4% β -Mercaptoethanol) 混勻。再加入 200 μ L 之 LDS 溶液 (Laemmli 1970) 混合後，於 100°C 熱水中悶熱 3–5 min，以 8,000 rpm (Spectrafuge 24D 型) 離心 5 min 後取上清液進行電泳分析。取電泳完之 SDS-PAGE 膠體，轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，並與 PIAMV-LV1 抗血清 (#184) 進行免疫反應。

直接組織轉漬法 (Direct tissue blotting; DTB)：將檢出有 PIAMV 之進口百合種球種植於溫室隔離管理之，分別取植株之鱗片組織、根系、植株葉片、莖部等部位組織，參考 Lin *et al.* (1990) 所發表之直接組織轉漬法及以往研究方法 (Chen & Chang 1999) 進行反應，以自製之 PIAMV-LV1 多元抗體 (#184) 進行百合病毒之檢測。將各部位組織以刀片切取後，將新鮮切面印漬於 Nylon 膜 (Stratagene, La Jolla, CA) 上，將 Nylon 膜依反應步驟之順序 (Chen & Chang 1999) 依次移入稀釋 1,000 倍之 PIAMV-LV1 IgG 抗體溶液 (1 mg mL⁻¹)、稀釋 6,000 倍之山羊抗兔免疫球蛋白 (Goat anti-rabbit IgG, Jackson, West Grove, PA) 中，各於室溫下反應 1 h，最終加入 BCIP/NBT 呈色液 (Alkaline phosphatase substrate kit, Bio-Rad, Hercules, CA) (Blake *et al.* 1984) 反應

之。受測樣品之正反應結果係以樣品轉漬印出現與健全對照樣品者有明顯差異之藍黑色反應作為判斷之依據 (圖 1)。

ELISA 與 DTB 法對檢測百合 PIAMV 之效率比較

為了解 ELISA 與 DTB 兩種病毒檢測方法、百合品種與百合不同取樣部位，是否對病毒檢出率結果具有交互作用及顯著差異性影響，本試驗選用百合進口種球並於溫室隔離栽培下，針對檢出有 PIAMV 並顯現典型黃化壞疽病徵之植株，取植株不同部位組織包括種球鱗片、根系、莖部及葉片等，分別以 Indirect ELISA 與 DTB 法進行檢測，分析各部位之病毒檢出率 [(病毒正反應數/檢測數) \times 100%]。本試驗選用 ConcaDor 及 Manissa 兩個品系各 11 株進行試驗，將前述不同部位組織所測得之病毒檢出率數據以 SAS JMP 程式 (version 10.0, SAS Institute, Cary, NC, USA) 進行因子變異數分析 (factor ANOVA) (Steel *et al.* 1997; Tukey 1953)，評估檢測方法、百合品種與檢測部位等三種因子對病毒檢出率之影響。

PIAMV-LV1 多元抗體及核酸引子對之專一性檢測

將 PIAMV-LV1 多元抗體與 PIAMV 抗原組織以及研究室所保存之不同罹病組織之 *Potexvirus* 屬病毒包括百合之 *Lily virus X* (LVX)、紅龍果之 *Cactus virus X* (CVX)、胡

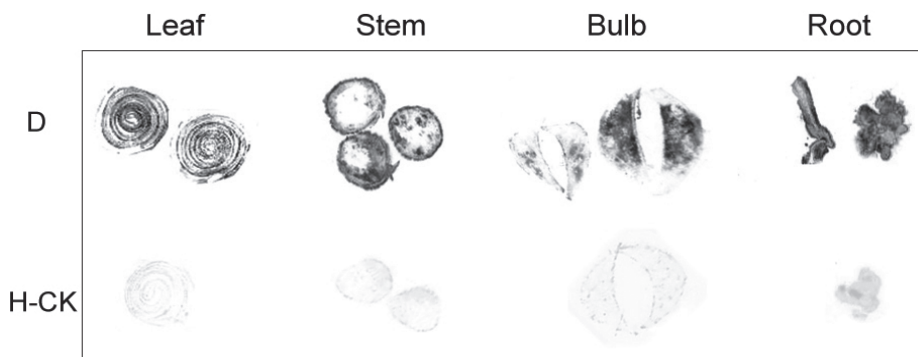


圖 1. 以直接組織轉漬法於百合不同部位檢測 *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) 之呈色結果。

Fig. 1. Direct tissue blotting revealing presence of *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) in different parts of symptomatic lily plant but not in those of healthy plant. D: Diseased tissue; H-CK: Healthy control.

蝶蘭之 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)、菸草之 *Potato virus X* (PVX)、百子蓮之 *Nerine virus X* (NVX)，以及感染百合之 *Potyvirus* 屬病毒 (*Lily mottle virus*; LiMV)，於 Indirect ELISA 及西方轉漬法中進行反應，以測試 PIAMV-LV1 多元抗體之檢測專一性。

於 RT-PCR 法中，以 PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw 引子對，檢測 PIAMV 罹病組織 (包括 Gracia-LV1、ConcaDor 及 Manissa 等百合品系之罹病種球組織)，以及上述不同病毒之罹病組織。RT-PCR 方法設定反應程序如上所述。

結果

PIAMV-LV1 病毒鞘蛋白分子選殖、定序分析及專一性檢測

本研究依據 GenBank 已登錄之 PIAMV 病毒核酸序列所設計之 PIAMV-cpup 及 PIAMV-cpdw 引子對，應用於 PIAMV 核酸分子之 RT-PCR 檢測，由進口種球 (LV1) 檢出有 PIAMV 之罹病組織所純化之全量核酸以此引子對進行 RT-PCR 反應，結果可增幅出與預估值相符大約 933 bp 之核酸片段 (圖 2)，經核苷酸定序結果顯示其具有病毒之核酸分子特性，其中對應鞘蛋白基因為 621 bp，並與日本學者於 GenBank 上已登錄之百合 *Plantago asiatica mosaic virus* 分離株 (acc. no. AB360794.1) 之鞘

蛋白胺基酸序列高達 93% 的相同度 (identity)。此鞘蛋白核酸序列分析結果顯示由進口百合所分離得之病毒核酸片段乃同為 *Potexvirus* 屬之 PIAMV 病毒的核酸分子。

另以 PIAMV-cpup 及 PIAMV-cpdw 引子對應用於由 Gracia、ConcaDor 以及 Manissa 品系之百合 PIAMV 罹病種球組織之病毒核酸分子增幅時，均可成功增幅出包含 PIAMV 鞘蛋白序列在內預估 933 bp 之核酸片段 (圖 2)，進一步將此等核酸片段選殖與定序分析結果，均含有 PIAMV 之分子特性 (結果未出示)。此引子對與其他受測的 *Potexvirus* 病毒 (包括 LVX、CVX、CymMV、PVX、NVX 等) 以及百合 LiMV 並無此 933 bp 核酸片段反應 (圖 2)，結果顯示 PIAMV-cpup 及 PIAMV-cpdw 引子對具有可專一地檢出 PIAMV 核酸分子之檢測效率。

病毒鞘蛋白表現與多元抗體製備、血清檢測效益

經由 *NcoI/XhoI* 所切取 576 bp 大小的 PIAMV-LV1 CP 部分片段次選殖於 pET28b (+) 表現載體並於 *E. coli* 宿主中進行蛋白表現誘導，進而獲得分子量約為 21 kDa 之表現蛋白。此表現蛋白經兔免疫注射後製備出對應 PIAMV-LV1 CP 的多元抗體 (#184)，可應用於不同的血清檢測法包括 ELISA (表 1)、SDS-



圖 2. 利用 PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw 引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應中進行 *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV)、不同 *Potexvirus* 病毒及 *Lily mottle virus* 之核酸分子檢測。行 M：核酸分子量標幟；行 LV1、Ma 及 Co 分別為 Gracia-LV1、Manissa 及 ConcaDor 百合之 PIAMV 罹病組織；行 L：*Lily virus X*；行 C：*Cactus virus X*；行 P：*Potato virus X*；行 N：*Nerine virus X*；行 Cy：*Cymbidium mosaic virus*；行 Li：*Lily mottle virus*；行 H：健康百合葉片。

Fig. 2. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of the *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV), different potexviruses and *Lily mottle virus* using the primer pair PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw primers. Lane M: molecular marker; Lane LV1, Ma and Co, PIAMV-infected lily tissue of Gracia-LV1, ConcaDor and Manissa, respectively; and lane L: *Lily virus X*; lane C: *Cactus virus X*; lane P: *Potato virus X*; lane N: *Nerine virus X*; lane Cy: *Cymbidium mosaic virus*; lane Li: *Lily mottle virus*; lane H: healthy tissue of lily. The predicted size of DNA fragments amplified from PIAMV-infected tissue was 933 bp by PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw primers.

免疫擴散反應法 (圖 3)、西方轉漬法 (圖 4)、以及直接組織轉漬法 (圖 1) 等。於 Indirect ELISA 法中, 將 #184 進行免疫球蛋白 IgG 純化後, 以 1 mg mL^{-1} 之濃度進行檢測, 結果顯示 #184 IgG 於稀釋 1,000 倍下有最佳的檢測效率 (結果未出示)。於 SDS-免疫擴散反應法中的結果顯示, #184 可與百合病組織以及接種至白藜的單斑病組織產生免疫沉澱反應, 且彼此間的沉澱線相融合, 呈現同源血清反應 (圖 3)。以直接組織轉漬法 (DTB) 進行免疫檢測, 以 BCIP/NBT 呈色液反應後, 植株不同部位之 PIAMV 罹病組織呈現藍黑色染色區, 與健康對照的組織顏色容易辨別區分, 惟病毒於濃度較低或分布不均之部位時, 染色結果呈現點狀不規則的分布 (如鱗片球組織) (圖 1)。

PIAMV 多元抗體於 Indirect ELISA (表 1) 及西方轉漬法 (圖 4) 中, 與不同來源之 *Potexvirus* 屬病毒 (包括 LVX、CymMV、CVX、NVX、PVX) 及感染百合之 *Potyvirus* 屬病毒 (LiMV) 等, 均只與 PIAMV 抗原組織產生正反應, 顯示本研究所自製之 PIAMV-LV1 多元抗體於此等血清法的檢測中, 具有專一性檢測之效益。

不同部位組織以及檢測法對百合 PIAMV 檢出率之比較

病毒檢測方法、百合品種與百合不同部位組織對百合 PIAMV 檢出率之影響, 經三因子變異數分析後 (Three-factor ANOVA), 結果顯示本研究所比較的百合品種 ConcaDor 及 Manissa 兩個品系對病毒檢測而言, 不具顯著差異性 (結果未顯示)。因此綜合兩品種受測植株之不同部位組織所獲得之病毒檢出率, 進一步針對病毒檢測方法 (ELISA 及 DTB 法), 以二因子變異數分析 (Two-factor ANOVA) 其影響性, 其結果顯示不同部位組織和檢測方法 (plant portions \times detection Method) 二因子間彼此具交互作用 ($F_{3,3} = 26.4, P < 0.0001$) (表 2), 即不同部位組織與檢測方法相互間對 PIAMV 檢出率具有顯著差異性的影響, 並非單一因子可影響此病毒之檢出率。當不同部位組織和檢測方法兩種因子間交互組合下所獲得

表 1. *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) 及 *Lily mottle virus* (LiMV) 抗體於間接酵素連結免疫吸附法中交互檢測不同病毒抗原。

Table 1. Reciprocal cross reactivities of antisera produced against *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) or *Lily mottle virus* (LiMV) with their respective antigens and others determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay^z.

Antigen ^x	ELISA reading ($A_{405\text{nm}}$) ^y	
	PIAMV	LiMV
PIAMV 1	3.44	0.12
PIAMV 2	2.96	0.13
PIAMV 3	2.75	0.14
PIAMV-LL	3.24	0.13
CymMV	0.03	0.06
CVX	0.03	0.04
LVX	0.08	0.09
NVX	0.04	0.09
PVX	0.03	0.06
LiMV	0.03	2.18
H-Lily	0.05	0.14
H-quinoa	0.04	0.09

^z Indirect ELISA was conducted to compare the serological relatedness between PIAMV and LiMV infecting lilies and other potexviruses. Immunoglobulins of the tested antisera were diluted at 1/1000 ratio to react with antigens which was diluted at 1/30 ratio.

^y Reactivities are shown as the absorbance readings ($A_{405\text{nm}}$) taken 40 min after addition of enzyme substrate solution. The absorbance values are an average of two replicate wells. Those reactivities lower than two times of the healthy control ($A_{405\text{nm}}$) are considered as negative reactions.

^x Antigens of PIAMV isolates (1–3) obtained from diseased lily tissues and PIAMV-LL from the local lesions of PIAMV on *Chenopodium quinoa*, different *Potexvirus* isolates including *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Cactus virus X* (CVX), *Lily virus X* (LVX), *Nerine virus X* (NVX) and *Potato virus X* (PVX), and the *Potyvirus* isolate-*Lily mottle virus* (LiMV) were used. Healthy lily tissues (H-Lily) and *C. quinoa* (H-quinoa) were used as control antigens.

之病毒檢出率差異, 以單獨用 DTB 法檢測時, 對百合莖部、葉部及根系所獲得者最高, 介於 $98.5\% \pm 7.1\%$ – 100% (表 3); 其次為以 ELISA 對莖部之檢出, 以及 DTB 對鱗片球和 ELISA 法對根系之病毒檢出率效果, 介於 $89.1\% \pm 20.8\%$ – $89.7\% \pm 18.4\%$ 之間; 而單獨以 ELISA 對鱗片球所得之病毒檢出率最低, 為 $15.8\% \pm 25.4\%$ (表 3)。

整體而言, 無論是於哪一種部位組織, 以

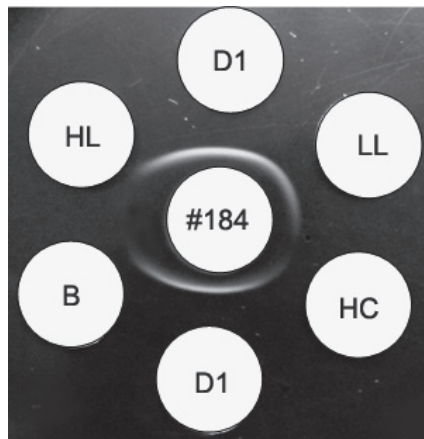


圖 3. 利用細菌表現之車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV) 鞘蛋白 所製備之多元抗體於 SDS-免疫擴散法之反應。#184: PIAMV 多元抗血清; D1: 百合 PIAMV 罹病組織; LL: 奎藜葉片上之 PIAMV 單斑; HL、HC: 健康百合及奎藜葉組織; B: KPB 緩衝液。

Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-immunodiffusion test of the antiserum produced against bacterial expressed coat protein of *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV). The central well was filled with antiserum (#184) against PIAMV. The peripheral wells were filled with SDS-treated antigens including D1, the PIAMV-infected lily tissue; LL, local lesions on *Chenopodium quinoa* caused by PIAMV; HL & HC, the healthy tissues of lily and *C. quinoa*, respectively; and B, KPB buffer.



圖 4. 應用細菌表現蛋白所免疫之車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV) 抗血清以西方轉漬法檢測 PIAMV、不同 Potexvirus 病毒及 *Lily mottle virus* 之效果。行 M: 蛋白質分子量標幟; 行 H: 健康百合葉片; 行 L: *Lily virus X*; 行 C: *Cactus virus X*; 行 P: *Potato virus X*; 行 N: *Nerine virus X*; 行 Cy: *Cymbidium mosaic virus*; 行 Li: *Lily mottle virus*; 行 D: 百合 PIAMV 罹病組織。

Fig 4. Western blotting of the antiserum produced against bacterial expressed coat protein of *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) for the detection of PIAMV, different potexviruses and *Lily mottle virus*. Samples were reacted to the 1000 \times -diluted antiserum to PIAMV. Lane M: protein marker; lane H: healthy tissue of lily; lane L: *Lily virus X*; lane C: *Cactus virus X*; lane P: *Potato virus X*; lane N: *Nerine virus X*; lane Cy: *Cymbidium mosaic virus*; lane Li: *Lily mottle virus*; and lane D: PIAMV-infected lily tissue.

DTB 法所得之病毒檢出率均高於 ELISA 所檢出者 (表 3)。針對百合植株地下部的種球部位之檢測，無論以 ELISA 或 DTB 法檢測所得之病毒檢出率，取樣根系檢測之結果均顯著地高於取樣鱗片組織檢測者；尤其當以 ELISA 法配合種球鱗片組織做為取樣點時所得之病毒檢

出率乃最低 (15.8% \pm 25.4%)，但此取樣點若以 DTB 法進行檢測，則可以顯著地提昇病毒檢出率達 89.3% \pm 25.3% (表 3)。若針對植株地上部的莖與葉片組織作檢測，以莖部為取樣點所得之病毒檢出率均高於葉片組織者 (表 3)。

表 2. 不同檢測方法及百合部位組織以二因子變異數分析其對 *Plantago asiatica mosaic virus* 檢出率之交互作用情形。

Table 2. Effect of detection methods and different portions of lily plants on virus detection rate of *Plantago asiatica mosaic virus* by two-factor ANOVA^z.

Treatment ^y	DF ^x	F Ratio	Prob > F
Plant portion	3	46.3012	< 0.0001*
Detection Method	1	97.5262	< 0.0001*
Plant portion x Detection Method	3	26.4029	< 0.0001*

^z Data of detection percentage of *Plantago asiatica mosaic virus* were analyzed by SAS JMP 10 (SAS Institute Inc., USA).

^y Four portions of lily plant including roots, bulb scales, stem and leaves were sampled for detection. Two detection methods including indirect ELISA and direct tissue blotting were conducted. Plant portion × Detection Method represents the interaction between these two factors.

^x DF, degree of freedom.

* Values are significant differences among levels of treatment at $P = 0.05$ according to the two-factor ANOVA.

表 3. 比較 Indirect ELISA 及直接組織轉漬法於不同百合部位組織所測得之 *Plantago asiatica mosaic virus* 檢出率。

Table 3. Comparison of the detection rate of *Plantago asiatica mosaic virus* from different parts of lily plants by the indexing methods of indirect enzyme-linked immunosorbent assay and direct tissue blotting.

Detecting method/Plant portion	Detection rate (%) ^z
DTB	
Leaf	99.5 ± 2.4 a ^y
Stem	100 a
Root	98.5 ± 7.1 a
Bulb scales	89.3 ± 25.3 ab
ELISA	
Leaf	76.3 ± 30.7 b
Stem	89.8 ± 18.4 ab
Root	89.1 ± 20.8 ab
Bulb scales	15.8 ± 25.4 c

^z The detection rates (%) [(No. positive samples/No. total samples) × 100%] of each plant portion were compared by the methods of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and direct tissue blotting (DTB).

^y Means with the same letter are not significantly different from each other at $P = 0.05$ according to Tukey HSD test (Tukey 1953).

討論

目前台灣的百合種球大多仰賴國外進口，病毒可能隨帶毒種球而引進國內，造成國內百合栽植與生育品質之風險。本研究由進口百合種球攔截到的罹病種球中所分離選殖到的病毒核酸，經核酸序列定序分析後確認為 PIAMV 的分離株。進一步以罹病組織的全量

核酸為模版進行病毒鞘蛋白基因增幅與選殖，於細菌生合成系統中成功地獲得病毒的鞘蛋白表現蛋白供作抗原來源，所製備成的 PIAMV-LV1 多元抗體可實際應用於 ELISA、SDS-免疫擴散反應、西方轉漬法及直接組織轉漬法 (DTB) 等血清檢測上。而依據 GenBank 上已登錄之 PIAMV 核酸序列，所設計可增幅包含全長度鞘蛋白基因序列之引子對 PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw，於本研究中除可成功應用於 Gracia 百合品系之 PIAMV-LV1 核酸片段大小 933 bp 的增幅外，亦可成功用於 ConcaDor 及 Manissa 等品系之百合罹病組織之 PIAMV 檢測，而不與其他受測 potexviruses 及 LiMV 反應，顯示其亦具有專一性檢測 PIAMV 之效益。因此 PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw 引子對除可用於 PIAMV 病毒之核酸分子檢測鑑定之需外，亦可進一步應用於此病毒不同分離株之 CP 增幅而進一步進行選殖與定序鑑定，強化了對此病毒檢定與分類鑑定之準確度。本研究針對 PIAMV 血清與核酸檢測試劑之開發成功，使國內首度具有自主檢定此病毒的有效試劑，進而能加以應用於此病毒檢測技術的開發。

本研究以 PIAMV-LV1 多元抗體於探討應用不同血清方法對百合 PIAMV 檢出率的影響上，結果顯示本研究中所使用的 ConcaDor 及 Manissa 兩個百合品系對病毒檢測不具顯著差異性之影響 (結果未顯示)。國內栽培之百合品系多樣化，百合品系對 PIAMV 檢出率之真正影響性尚需更多品種之比較以獲得更明確而客觀之結果。本研究中，檢測方法與植株不

同取樣部位具有交互作用且顯著地影響病毒檢出率之結果，於不同百合植株部位組織包括莖部、葉部、鱗片組織及根系，無論是取哪一種部位組織，以 DTB 法所得之病毒檢出率均顯著地高於 ELISA 所檢出者。直接組織轉漬法 (direct tissue blotting; DTB, 或稱 direct tissue blot immunoassay; DTBIA, tissue-blot immunoassay; TBIA) 已成功應用於多種植物病毒之快篩檢測 (Lin *et al.* 1990; Srinivasan & Tolin 1992; Garnsey *et al.* 1993; Makkouk & Kumari 1996; D'Onghia *et al.* 2001; Korkmaz 2002; Fegla *et al.* 2009)，且其檢測效率與敏感度優於 ELISA 法者已有見諸其他不同作物病毒的報告，包括 *Impatiens* 作物上的 *Tomato spotted wilt virus* (Hsu & Lawson 1991)、蘭花之 *Cymbidium mosaic virus* (Hsu *et al.* 1992)、柑橘之 *Citrus tristeza virus* (Garnsey *et al.* 1993)、以及百合之 *Lily symptomless virus* (Hsu *et al.* 1995) 等，而筆者以往研究結果也顯示夜來香 *Tuberose mild mottle* 的種球檢測，病毒檢出率以 DTB 法之結果顯著地優於 ELISA 檢出者 (Chen & Chang 1999)。DTB 法的取樣方便，同樣適合於大量樣品的快速篩檢 (Hsu *et al.* 1992)，在病毒檢出率等同或是優於 ELISA 的前提下，為一種更為簡便而有效率的血清檢定方式，尤其用於此等以種球繁殖的球根花卉之病毒檢測上。

以百合植株地下部之種球為取樣標的時，若選取種球鱗片為取樣點進行檢測，則需配合 DTB 法，方可以顯著地提昇病毒檢出率達。以同為種球上的鱗片組織與根系而言，無論以 ELISA 或是 DTB 法進行檢測，由根系取樣所獲得之病毒檢出率均顯著地高於鱗片組織，此結果顯示根系取樣對於病毒檢出率為最穩定而適於百合種球部位檢測 PIAMV 病毒之需。日本學者 Sugiyama *et al.* (2008) 所開發之四種百合病毒核酸檢定試劑中，亦採取百合球根之根系進行 LiMV、LSV、CMV 及 PIAMV 等病毒之核酸檢測以提升其檢出病毒之效益。而地上部的莖部與葉片組織，以莖部為取樣點所得之病毒檢出率均高於葉片組織者，因此地上部植株的取樣點採以莖部組織配合 DTB 法可快

速而準確地進行百合植株的 PIAMV 檢定。

PIAMV 是一種寄主範圍廣的 *Potexvirus* 病毒，依據國外之報告，PIAMV 原始發現於車前草，其他天然寄主尚包括有南天竹、歐洲櫻草、百合屬之胭脂花，以及天女報春花等。以車前草而言，此植物是台灣田間或路邊常見之野生性植物之一，若 PIAMV 隨百合種球進口引進國內，則存在有被 PIAMV 感染之風險而造成病毒在本地之存活能力。因此，PIAMV 檢測試劑的開發成功，未來將可有效應用於監測國內車前草是否帶有此病毒，預防可能的天然寄主感染源以杜絕 PIAMV，進而維護國內百合生產的安全性。

近年來國內之百合種球來源，每年由歐洲的荷蘭、及南半球的智利、紐西蘭等國進口，以因應全年生產百合切花之需要 (農委會農產貿易統計查詢系統，<http://agrapp.coa.gov.tw/TS2/TS2Jsp/TS20202.htm>)。PIAMV 目前之報告見諸於前蘇聯、日本、美國及荷蘭等國；台灣的百合種球主要來自國外進口，以目前國外已有報導 PIAMV 有發生於百合上，因此對於進口的百合種球，國內若能具有可自主檢測 PIAMV 之檢測試劑與提升病毒準確度之檢定技術，則可應用予此病毒之檢定以降低或防杜病毒可能隨種球引入台灣發生病毒病害的風險。

本研究所開發之 PIAMV-LV1 抗血清，針對 PIAMV 之檢測具有高專一性，而且於免疫檢測法中應用 DTB 法，針對種球根系的採樣所得之病毒檢出率顯著地高於種球鱗片組織取樣的檢出，尤其種球根系的少量取樣並不會影響到種球的生長效率，加上 DTB 法具有方便採樣、檢測快速的特性，其對 PIAMV 的檢出率又顯著地高於 ELISA 法，因此對於百合植株之種球部位的 PIAMV 病毒檢測，根系取樣配合 DTB 法可提供更準確的病毒檢定。本研究之結果可提供於未來針對進口百合種球與田間百合植株為對象而建立的 PIAMV 檢定模式之參考，以縮短檢定時間與強化檢防疫效益。

引用文獻

Blake, M. S., K. H. Johnston, G. I. Russell-Jones, and

- E. C. Gotschlich. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136:175–179.
- Chang, C. A., M. J. Lin, C. C. Chen, T. C. Deng, and J. Y. Liao. 2001. Molecular evidence for the infection of *Strawberry latent ringspot virus* in lily. *Plant Pathol. Bull.* 10:55–64. (in Chinese with English abstract)
- Chen, C. C. and C. A. Chang. 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. (in Chinese with English abstract)
- Chen, C. C., T. Hsiang, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2002. Molecular characterization of *Tuberose mild mosaic virus* and preparation of its antiserum to the coat protein expressed in bacteria. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43:13–20.
- Chiang, F. L., C. A. Chang, Y. H. Cheng, and C. C. Chen. 2011. Serological and molecular identification of *Nerine virus X* infecting Africa lily (*Agapanthus africanus* L.) and development of its detection techniques. *J. Taiwan Agric. Rec.* 60:89–100.
- Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475–483.
- Cohen, J., A. Gera, and G. Loebenstein. 1995. *Strawberry latent ringspot virus* in lilies. *Eur. J. Plant Pathol.* 101:217–219.
- Derks, A. F. L. M. 1995. Lily. p.313–321. *in: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops.* (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) John Willey & Sons. West Sussex, United Kingdom. 543 pp.
- D’Onghia, A. M., K. Djelouah, K. D. Frasher, and O. Potere. 2001. Detection of *Citrus psorosis virus* by direct tissue blotting immunoassay. *J. Plant Pathol.* 83:139–142.
- Fegla, G. I., M. A. I. Kawanna, and M. M. Fath-Allah. 2009. Detection of pea seed-borne mosaic virus (PSBMV) in individual and grouped samples by indirect ELISA and tissue blot immunoassay, TIBA. *Ann. Agric. Sci.* 54:449–460.
- Garnsey, S. M., T. A. Permar, M. Carmbra, and C. T. Henderaon. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). p. 39–50. *in: Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologist.* (Moreno, P., J. V. da Graca, and L. W. Timmer, eds.) Riverside, CA.
- Hughes, P. L., F. Harper, M. T. Zimmerman, and S. W. Scott. 2005. *Nandina mosaic virus* is an isolate of *Plantago asiatica mosaic virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 113:309–313.
- Hsu, H. T., J. Y. Kim, and R. H. Lawson. 1995. Purification of lily symptomless carlavirus and detection of the virus in lilies. *Plant Dis.* 79:912–916.
- Hsu, H. T. and R. H. Lawson. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens*. *Plant Dis.* 75:292–295.
- Hsu, H. T., D. Vongsasitorn, and R. H. Lawson. 1992. An improved method for serological detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* in orchids. *Phytopathology* 82:491–495.
- Komatsu, K., Y. Yamaji, J. Ozeki, M. Hashimoto, S. Kagiwada, S. Takahashi, and S. Namba. 2008. Nucleotide sequence analysis of seven Japanese isolates of *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV): a unique potexvirus with significantly high genomic and biological variability within the species. *Arch. Virol.* 153:193–198.
- Korkmaz, S. 2002. Application of direct tissue blot immunoassay in comparison with DAS-ELISA for detection of Turkish isolates of Citrus Tristeza Closterovirus (CTV). *Turk. J. Agric. For.* 26:203–209.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227:680–685.
- Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of dasheen mosaic virus (*Caladium* isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. *Arch. Virol.* 143:2461–2469.
- Lin, N. S., Y. H. Hsu, and H. T. Hsu. 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80:824–828.
- Makkouk, K. M. and S. G. Kumari. 1996. Detection of ten viruses by the tissue-blot immunoassay (TBIA). *Arab. J. Plant Prot.* 14:3–9.
- Memelink, J., C. I. M. Van der Vlugt, H. J. M. Linthorst, A. F. L. M. Derks, C. J. Asjes, and J. F. Bol. 1990. Homologies between the genomes of a carlavirus (*Lily symptomless virus*) and a potexvirus (*Lily virus X*) from lily plants. *J. Gen. Virol.* 71:917–924.
- Miglino, R., A. Jodlowska, and A. R. van Schadewijk. 2006. Detection and identification of a novel *Potexvirus* infecting *Allium* by paramagnetic beads ssRNA isolation and one tube RT-PCR assay with a new *Potexvirus* genus primer set. *Acta Hort.* 722:285–292.
- Ozeki, J., S. Takahashi, K. Komatsu, S. Kagiwada, K. Yamashita, T. Mori, H. Hirata, Y. Yamaji, M. Ugaki,

- and S. Namba. 2006. A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica mosaic virus* contributes to systemic necrosis. *Arch. Virol.* 151:2067–2075.
- Purcifull, D. E. and D. L. Batchelor. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. *Fla. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 788:31–39.
- Solovyev, A. G., V. K. Novikov, A. Merits, E. I. Savenkov, D. A. Zelenina, L. G. Tyulkina, and S. Y. Morozov. 1994. Genome characterization and taxonomy of *Plantago asiatica mosaic potexvirus*. *J. Gen. Virol.* 75:259–267.
- Srinivasan, I. and S. A. Tolin. 1992. Detection of three viruses of clovers by direct tissue immunoblotting. *Phytopathology* 82:721.
- Steel, R. G. D., J. H. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. 3rd edition. WCB/McGraw-Hill Press. USA. 666 pp.
- Sugiyama, S., C. Masuta, H. Sekiguchi, T. Uehara, H. Shimura, and Y. Maruta. 2008. A simple, sensitive, specific detection of mixed infection of multiple plant viruses using macroarray and microtube hybridization. *J. Virol. Methods* 153:241–244.
- Takeuchi, T. and J. Sasaki. 2003. A potexvirus causing necrosis of lily, is one strain of *Plantago asiatica mosaic virus* (PLAMV). *Jpn. J. Phytopathol.* 69:329.
- Tukey, J. W. 1953. The Problem of Multiple Comparisons. Mimeographs Princeton University. Princeton, N. J. USA. 215 pp.
- Yamashita, K., Y. Fukui, and Y. Kanno. 2003. *Potexvirus* isolated from lily and primrose. *Jpn. J. Phytopathol.* 69:32.
- Zheng, H. Y., J. Chen, M. F. Zhao, L. Lin, J. P. Chen, J. F. Antoniw, and M. J. Adams. 2003. Occurrence and sequences of *Lily mottle virus* and *Lily symptomless virus* in plants grown from imported bulbs in Zhejiang province, China. *Arch. Virol.* 148:2419–2428.

Serological Reagent Preparation and Improvement of Serological Method for the Detection of *Plantago asiatica mosaic virus* in Lily

Chin-Chih Chen^{1*}, Yu-Ling Jhang², Bi-Yun Lin², Fen-Lang Chiang²,
Ying-Huey Cheng³, and Ting-Chin Deng⁴

Abstract

Chen, C. C., Y. L. Jhang, B. Y. Lin, F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2013. Serological reagent preparation and improvement of serological method to detect the *Plantago asiatica mosaic virus* in lily. *J. Taiwan Agric. Res.* 62(3):268–279.

In early 2011, a viral nucleic acid fragment belonging to the *Potexvirus* was detected by RT-PCR in imported lily bulb. The virus was identified as *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) and that was confirmed by nucleotide sequence analysis. A predicted 933-bp DNA fragment containing the full-length sequences of viral coat protein gene was amplified by RT-PCR with the primer pair PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw (5'-CCGCGGCCGCCACTACTC/5'-GGCCCACCAGACTTTCCT), designed based on alignment of seven PIAMV nucleotide sequences in the database of GenBank. The deduced amino acid sequence of coat protein gene of the virus found in the imported lily bulb is 93% identical to that of the PIAMV (GenBank accession no. AB360794.1). The viral coat protein expressed by bacteria was prepared for antiserum production. The antiserum was shown to be able to specifically detect the PIAMV in indirect ELISA and western blotting. For detection of the virus distributed in lily plant, the indexing efficiency of direct tissue blotting (DTB) was significantly higher than that resulted in ELISA. The rates of detectable PIAMV from roots were significantly higher than those from the bulb scales. As well, different isolates of PIAMV CPs from various lily lines could be specifically detected by RT-PCR using the primer pair of PIAMV-cpup/PIAMV-cpdw. Accordingly, serological or molecular reagents developed in this study are both useful for virus-indexing; moreover, DTB is an effective serological method to improve the detection efficacy of PIAMV from lilies.

Key words: Virus disease of *Lilium* spp., *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV), Antiserum preparation, Direct tissue blotting, RT-PCR detection.

Received: May 17, 2013; Accepted: August 7, 2013.

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

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

² Research Assistant, Plant Pathology 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.