

齒舌蘭輪斑病毒及蕙蘭嵌紋病毒感染蝴蝶蘭之病徵學及細胞病理學探討¹

陳慶忠²、陳煜焜³、柯文華²、葉士財²

摘 要

蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)及齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)為臺灣地區感染蝴蝶蘭最普遍的二種病毒。CymMV感染蝴蝶蘭後引發多種類型的病徵，主要有黃化斑、黃化嵌紋斑、葉脈黃化、壞疽凹陷條斑或輪斑及全葉性黃化等徵狀。ORSV的病徵種類則相對單純，主要引起系統性黃化病徵。CymMV病毒顆粒呈略彎曲長絲狀，其長度介於447~558 nm，平均為484 nm，直徑為15 nm；ORSV病毒顆粒呈直桿狀，其長度介於254~346 nm，平均為299 nm，直徑為18 nm。多數ORSV顆粒可觀察到一條明顯的橫溝(central canal)構造，CymMV則無此特徵。罹病組織超薄切片電子顯微鏡觀察顯示，CymMV在病組織內聚集排列呈紡錘狀、層狀結晶排列、或不規則散佈於細胞質內；ORSV則聚集成規則的結晶狀、排列呈層狀、或呈不規則分佈於細胞質中。此等病徵特性及電顯觀察結果，或可應用於辨識蝴蝶蘭病毒之參考。

關鍵字：蝴蝶蘭、蕙蘭嵌紋病毒、齒舌蘭輪斑病毒、病徵、電子顯微鏡。

前 言

蝴蝶蘭為蘭屬(genus *Phalaenopsis*)，著生蘭中單莖類植物，為臺灣蘊育豐富的蘭屬植物資源之一⁽⁵⁾。民國70年代起臺灣經濟漸趨繁榮，大型蘭園紛紛興建，經營模式並走向專業化、現代化、企業化及國際化。目前估計全臺之栽培面積約110 ha，年外銷1,597萬棵，年產值約新臺幣24億元；內銷約600萬棵，年產值約新臺幣12億元，為當前國內最具發展潛力之重要花卉產業⁽¹⁾。政府為積極提升蝴蝶蘭產業之國際競爭力，行政院乃推動「挑戰2008年國家發展重點計畫」，並於民國92年在臺南縣成立臺灣蘭花生物科技園區。預定至民國97年將累計投資總金額達新臺幣20億元於開發此面積達200 ha的蘭花生技園區，朝建立臺灣成為蘭花王國的目標努力。現階段的臺灣蝴蝶蘭栽培所面臨的最大瓶頸之一是植株感染病毒的問題。許多蘭園均遭遇病毒感染的困擾，在栽培過程中一旦發現罹病嚴重之植株，均以消極的拔除病株(eradiacation)為處理手段。外銷的蝴蝶蘭在出口前，多將肉眼辨識無病徵者視同健康植株，

¹行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0654 號。

²行政院農業委員會臺中區農業改良場研究員兼課長、技工、助理研究員。

³國立中興大學植物病理學系副教授。

唯當蘭株運抵進口國後，往往發現病徵陸續顯現，對商品品質及商譽均有不良的影響。欲解決臺灣蝴蝶蘭產業感染病毒的問題，可能要從三個方向去思考：(一)業者必須對病毒對蝴蝶蘭的感染及其嚴重性有所認知，尤需著眼於培植長期性的國際競爭力，此有賴於對栽培者及業者的教育與宣導；(二)病毒感染的問題並非業者個人能力所能解決，有賴政府積極投入更多試驗單位與人員於偵檢未知病毒的工具與技術的研發，方能有效掌握蝴蝶蘭栽培過程中發生的病毒病害，並能據此研發對策；(三)一旦業者對病毒之威脅性有所認知，配合試驗單位已提升的病毒診斷鑑定之能力，將可確保蝴蝶蘭健康組培母本之取得，再配合健康種苗驗證制度的確實實施，方能確確實實逐步提升我國蝴蝶蘭產業國際競爭力。

已知可感染蘭屬植物之病毒計28種^(5,15,18,22)，其中16種之特性已被清楚闡述，包括 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cymbidium ringspot virus* (CyRSV), *Dendrobium mosaic virus* (DenMV), *Clover yellow vein virus* (CYVV), *Dendrobium vein necrosis virus* (DVNV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Orchid fleck virus* (OFV), *Tobacco mosaic virus-orchid strain* (TMV-orchid), *Tobacco rattle virus* (TRV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Tomato spotted wild virus* (TSWV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Vanilla mosaic virus* (VanMV)等^(5,18,22)。國內蝴蝶蘭栽培已記錄發生之病毒包括CymMV、ORSV、CMV、CaCV (*Capsicum chlorotic virus*)及PhCSV (*Phalaenopsis chlorotic spot virus*)^(2,4,5,7,8,23,24)。筆者等自2004年3月至2006年12月間於本場轄區內臺大(大村鄉)、臺大(仁愛鄉)、大和(埔鹽鄉)、皇基(烏日鄉)、四維(新社鄉)、兄弟(竹山鎮)等蘭園，共採集1150株經肉眼辨識有類似由病毒引起之病徵的蝴蝶蘭植株樣品，經以ORSV、CymMV、CMV、CaCV、PhCSV及一種未發表的蘭花病毒(代號179)抗血清進行indirect ELISA檢測，其結果顯示CymMV和ORSV為最主要的兩種為害蝴蝶蘭的病毒，其中單獨或混合感染CymMV者高達51.5%，而單獨或混合感染ORSV者則亦高達22.2% (未發表資料)。雖然目視病徵不常單獨當做診斷病毒病害之依據，然而就所檢測的1,150個樣本中，仍能約略歸納出蝴蝶蘭單獨感染CymMV或ORSV後所呈現的代表性病徵。本文就筆者等在進行蝴蝶蘭病毒調查時，所蒐集單獨感染CymMV或ORSV之具有的代表性病徵，以及該等罹病植株材料以電子顯微鏡觀察細胞病理的結果提出報告，或可供為業者在栽培過程中初步判斷蝴蝶蘭感染病毒種類的參考。

材料與方法

病毒材料

就中部地區選定包括彰化縣臺大蘭園(大村鄉)、大和蘭園；南投縣兄弟蘭園、臺大蘭園(仁愛鄉)；臺中縣皇基蘭園(烏日鄉)、四維蘭園(新社鄉)等蘭園，於2004年3月至2006年12月間不定期巡迴調查取樣，以肉眼辨識蝴蝶蘭顯現疑似病毒感染的病徵之植株，於實驗室內以CymMV、ORSV、CMV、CaCV、PhCSV及179等六種抗血清進行indirect ELISA分析，篩選出

單獨感染CymMV及ORSV的樣品。此等indirect ELISA檢測篩選過的非複合感染樣品，分別再機械接種於菸草(*Nicotiana benthamiana*)及莧藜(*Chenopodium quinoa*)，待發病後再以前述六種抗血清重覆以indirect ELISA檢測一次，以確認原始病株單獨感染CymMV或ORSV。罹病蝴蝶蘭或機械接種發病之莧藜、紅藜及菸草等材料提供為電子顯微鏡細胞病理研究之用。

病徵

經二次抗血清確認為單獨CymMV感染或單獨ORSV感染之罹病蝴蝶蘭葉片，逐一拍照並描述病徵特性。但本試驗僅就採樣時所取得的病株進行病徵描述，並未對蝴蝶蘭不同生育期感染CymMV及ORSV的病勢進展進行觀察。

電子顯微鏡觀察

陰染法：感染CymMV或ORSV之蝴蝶蘭葉片粗汁液機械接種莧藜後產生之單斑組織粗汁液或純化之病毒懸浮液與0.1% bacitracin (V:V=1:1)之混合液，依Christie *et al.* (1987)⁽⁹⁾方法以銅網吸附病毒顆粒後，再以2%醋酸鈾(uranyl acetate)染色；並以電子顯微鏡(JEOL JEM-200CX)觀察病毒顆粒之形態。CymMV及ORSV分別選測50個病毒顆粒計算其長度及寬度。樣品中有明確斷裂之顆粒不予取樣度量。

超薄切片法：上述CymMV及ORSV感染之罹病葉片組織，以2%戊二醛(glutaraldehyde)及1%四氧化銻(osmium tetroxide)做前、後固定，再以酒精系列脫水和LR White樹脂滲透包埋後，於超薄切片機(Reichert-Jung Ultracut S)切取60~70 nm厚度的切片，經2%醋酸鈾溶液預染及檸檬酸鉛(lead citrate)複染後，以電子顯微鏡觀察罹病組織之細胞病變情形。

酵素連結免疫分析

間接酵素連結免疫分析(indirect ELISA)係依Koenig(1981)⁽¹⁷⁾之方法進行。供試蝴蝶蘭葉片以9倍量(W/V)之coating buffer (1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃, 1,000 ml H₂O, pH 9.6)研磨，取200 μl置入微量盤之孔穴中，於37°C靜置2.5 hr後用PBST (8 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 2.9 g Na₂HPO₄, 7H₂O, 0.2 g KCl, 0.2g NaN₃, 0.5 ml Tween-20, 1,000 ml H₂O, pH 7.4)洗滌3次。加入以conjugate buffer (2% PVP-40, 0.2% ovalbunin, 1,000 ml PBST)稀釋1,000倍之兔子抗血清或稀釋5,000倍之老鼠單元抗體，於37°C靜置2 hr後，用PBST清洗3次。視第一次抗體(first antibody)種類再加入以conjugate buffer稀釋之鹼性磷酸酵素標示之山羊抗兔免疫球蛋白(goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Jackson) (稀釋5,000倍)或山羊抗鼠免疫球蛋白(goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate, Jackson) (稀釋1,000倍)，於37°C靜置2 hr或於4°C過夜後，用PBST清洗3次，每穴加入200 μl以substrate buffer (97 ml diethanolamine, 800 ml H₂O, 0.16 g NaN₃, pH 9.8)配製之酵素基質(p-nitrophenyl phosphate, disodium, Sigma, 1 mg/ml)試液並靜置反應20~60 min後，每穴再加入50 μl之3 M NaOH停止反應。以ELISA測讀儀(Bio-Tek Instruments, Burlington, VT, USA)讀取波長405 nm之吸收值。正反應以大於健康樣本(負對照)的A₄₀₅讀值3倍以上判定之。在檢測分析過程中，ELISA讀值判讀模稜兩可者，均以原樣品粗汁液機械接種莧藜，發病後再行一次ELISA分析以確認感染病毒之種類。ELISA試驗使用本試驗室自行製備的CymMV、CMV、PhCSV及179之抗血清，以

及由農試所張清安博士提供的ORSV抗血清；CaCV單元抗體則由中興大學植病系詹富智博士提供。

結 果

病徵

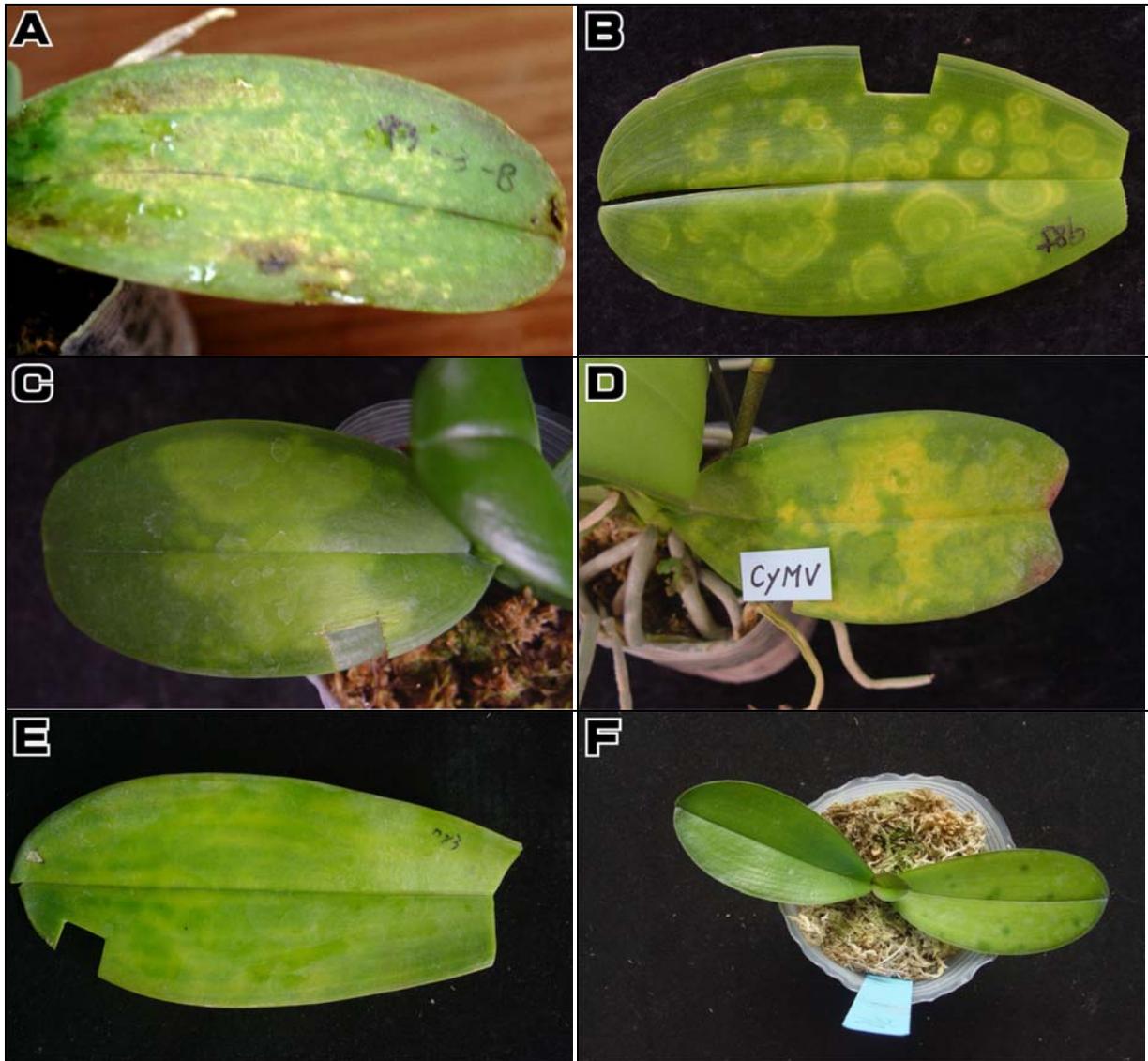
蝴蝶蘭感染病毒可能因品種、感染時植齡及季節等不同，表現病徵會有差異。本項調查由於採樣時品種認定困難，因此並未就取樣之蝴蝶蘭品種加予區分，本文僅依據所觀察並經ELISA鑑定為單獨感染CymMV及ORSV之罹病蝴蝶蘭出現頻率高並具有代表性之病徵加予分類描述。

蕙蘭嵌紋病毒(CymMV)感染蝴蝶蘭均呈系統性感染。一般而言，罹病株僅於先期感染之1~3葉片表現明顯之病徵，同一罹病株之其他葉片則或出現局部性病徵，或完全無病徵。由檢測的樣品觀察推測，蝴蝶蘭感染CymMV後，其發病初期的病徵應是於葉片產生黃色或淡黃色、大小約0.2~0.5 cm的近似圓形斑，隨著病勢進展，病徵外觀會有很大變化，茲依調查時發現之病徵特性區分為下類各型：

1. 黃化斑：CymMV感染蝴蝶蘭引起的黃化斑在外觀上有極大的變化，難予一一陳述，僅就其中最常見者概述之。有者於罹病葉片產生許多分散之淡色小黃斑，其中部分小黃斑轉呈壞疽狀，發病中、後期壞疽斑色澤加深而呈黑褐色(圖一、A)；有者形成大小不一之黃化環斑(圖一、B)或癒合成大型黃化塊斑(圖一、C)；有者形成濃淡不均的不規則雲狀黃化斑(圖一、D)；有者則呈現全葉性黃化並間雜淡綠或深綠島斑(green islands)(圖一、E和F)。
2. 葉脈黃化：罹病葉的葉脈黃化(vein chlorosis)，使葉片呈現明顯的連續或斷續狀黃化條紋(圖二、A和B)。有時可見黃化部位擴及葉脈兩側的葉肉組織，使條斑成兩側不平滑狀(圖二、B)。
3. 凹陷壞疽斑：罹病葉出現條狀(圖二、C)、環狀(圖二、D)、波浪狀(圖二、D)或輪紋狀(圖二、E)的凹陷壞疽斑，部份壞疽會在後期轉變成黑褐色(圖二、F)。這類凹陷狀的壞疽紋可能是由前述黃化斑在病程的後半階段轉化而成，此類病徵為CymMV感染者所特有，在紅花系尤常發現。

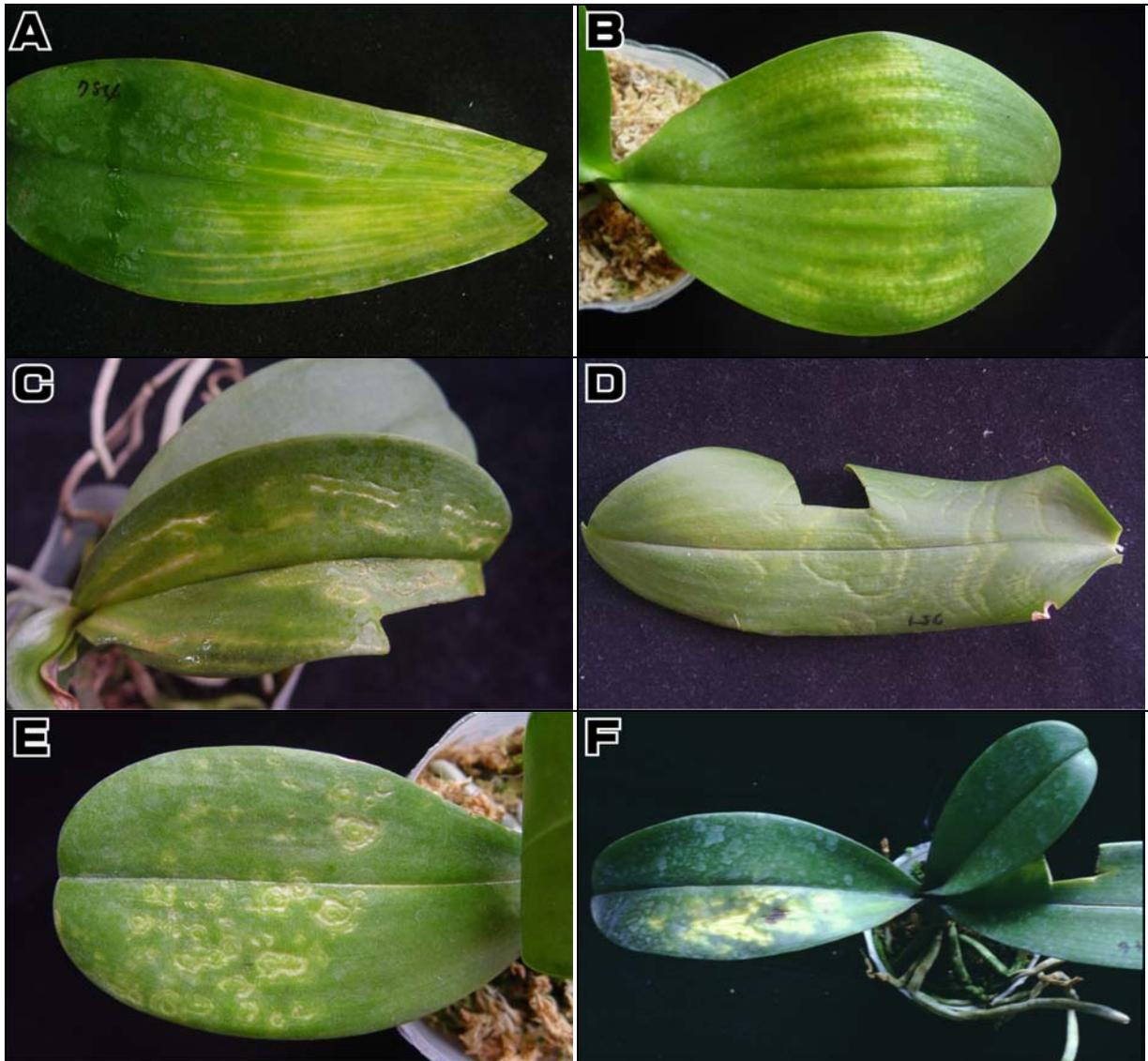
齒舌蘭輪斑病毒(ORSV)感染引起者

ORSV感染蝴蝶蘭所引起的病徵與CymMV引起的病徵有相似處，罹病植株亦呈系統性感染，罹病株亦可能僅1~2葉片表現明顯之病徵，而其它葉片病徵則不明顯，甚或無病徵。所不同者，ORSV的病徵類型較CymMV感染所引起者相對單純，主要產生嵌紋(圖三、A)、黃化輪斑(圖三、B)、黃化弧狀條斑(圖三、C)及黃化壞疽斑(圖三、D)。前述CymMV引起的凹陷壞疽條紋徵狀則未曾在ORSV單獨感染的樣本上發現。



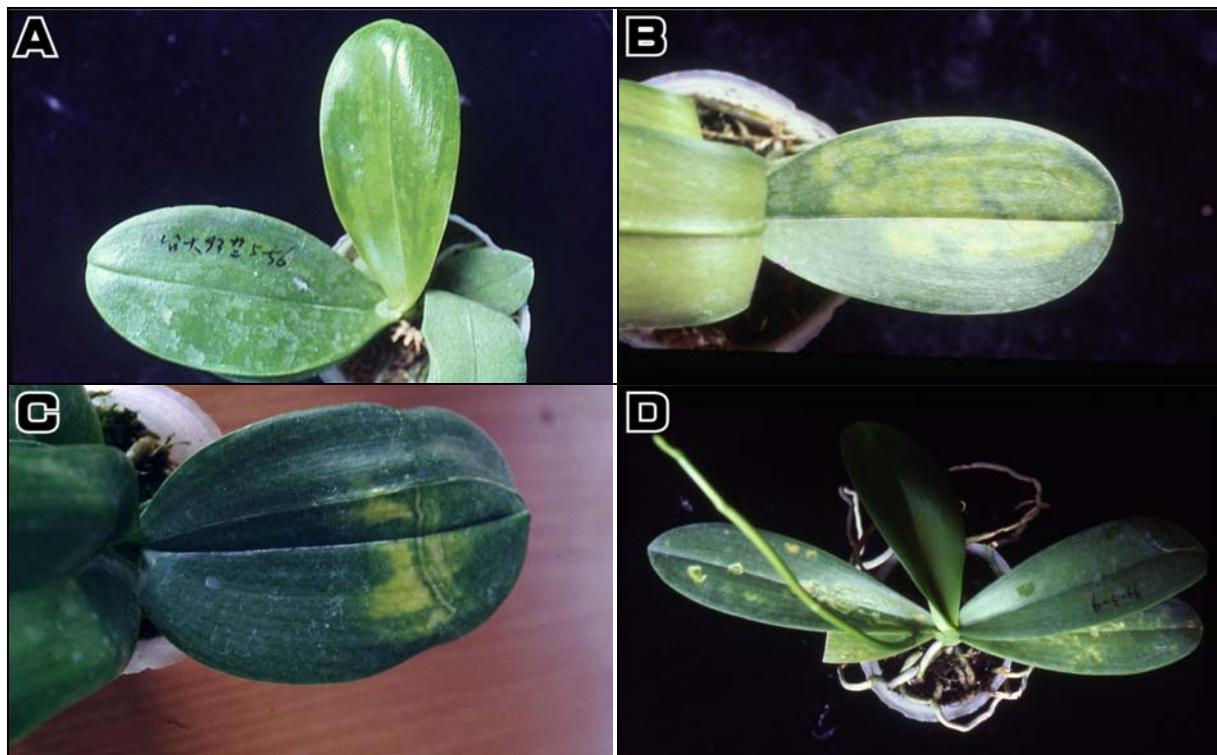
圖一、蕙蘭嵌紋病毒(CymMV)感染蝴蝶蘭引起之黃化型病徵。A、黃化斑點，後期黃化斑點轉變成灰黑色壞疽斑；B、黃化輪斑；C、大型黃化斑塊；D、黃化雲狀斑；E和F、全葉性黃化間雜綠色島斑。

Fig. 1. Symptoms of chlorosis induced by *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) on leaves of *Phalaenopsis* orchids. A. Chlorotic spots; B. Chlorotic ringspots; C. Chlorotic blotches; D. Cloud-like chlorotic lesions; E and F, Holo-chlorosis with green islands.



圖二、蕙蘭嵌紋病毒(CymMV)感染蝴蝶蘭引起之黃化壞疽型病徵。A 和 B、葉脈黃化；C、壞疽條斑；D、壞疽環斑和波浪狀斑；E、壞疽輪紋斑；F、黑變的壞疽斑。

Fig. 2. Symptoms of chorotic necrosis induced by *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) on leaves of *Phalaenopsis* orchids. A and B, vein chlorosis; C, necrotic streaks; D, Necrotic circular and wave-shaped patterns; E, necrotic ringspots; and F, necrotic spot turned dark at late phase of infection.



圖三、齒舌蘭輪斑病毒(ORSV)感染蝴蝶蘭引起之病徵。A、黃化嵌紋；B、黃化輪斑；C、黃化弧狀條斑；D、黃化壞疽斑。

Fig. 3. Symptoms induced by *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) on leaves of *Phalaenopsis* orchids.

A. Chlorotic mosaic; B. Chlorotic ringspots; C. Patterns of chlorotic arch; D. Spots with chlorotic necrosis.

電子顯微鏡觀察

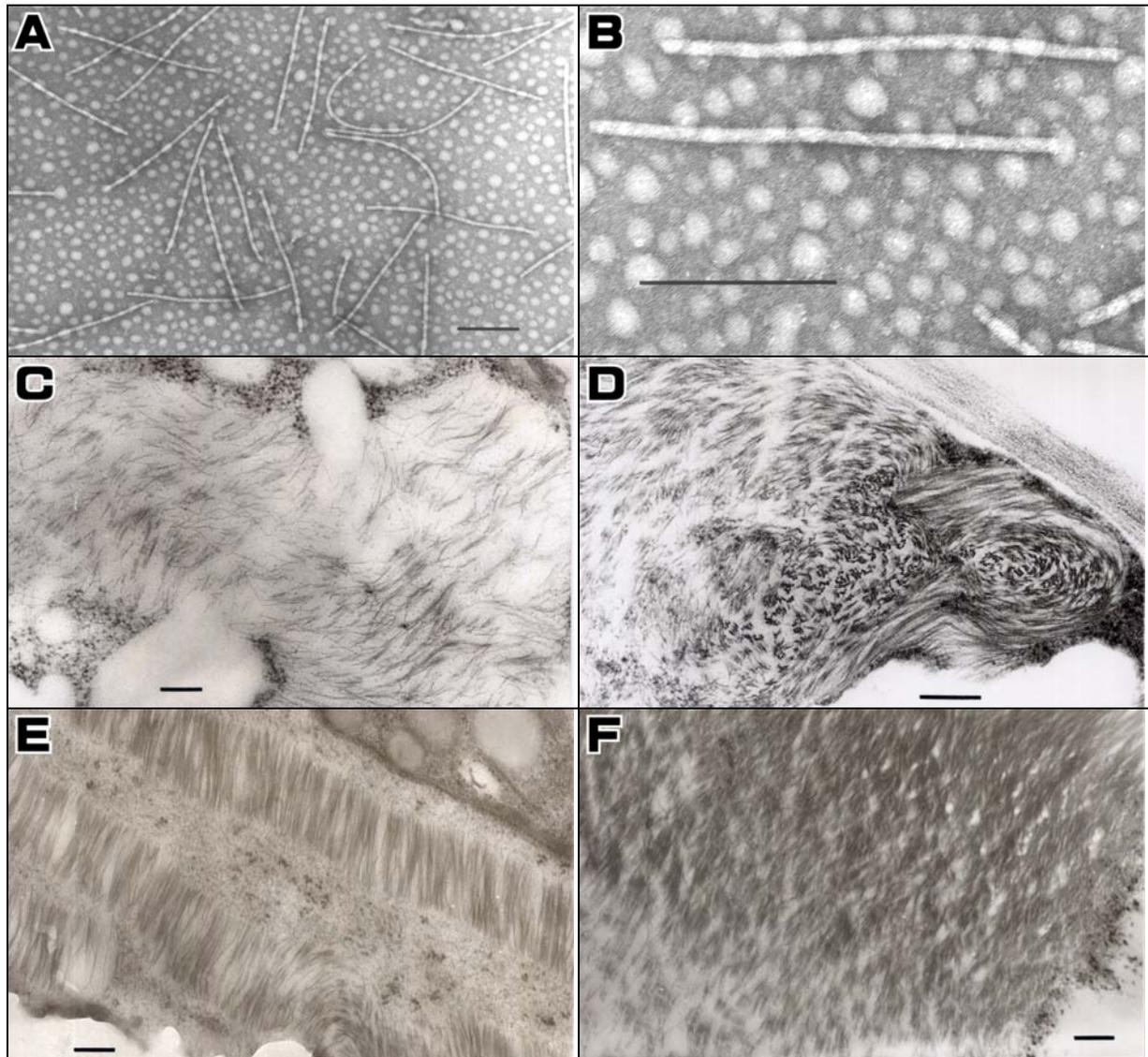
蕙蘭嵌紋病毒(CymMV)

CymMV為Potexvirus屬病毒，病毒顆粒呈彎曲長絲狀(filamentous rods)(圖四、A)，其長度介於447~558 nm，平均為484 nm，直徑為15 nm。病毒顆粒鞘蛋白呈螺旋狀對稱構造，二鞘蛋白螺旋狀對稱構造間有明顯之橫帶(crossbanding)(圖四、B)。超薄切片顯示，在罹病莖葉組織細胞內病毒顆粒呈鬆散狀不規則隨機分散(圖四、C)，或聚集成紡錘狀(圖四、D)，或排列成層狀結晶(圖四、E)，或大量病毒顆粒於細胞質內緊密聚集成堆(圖四、F)。

齒舌蘭輪斑病毒(ORSV)

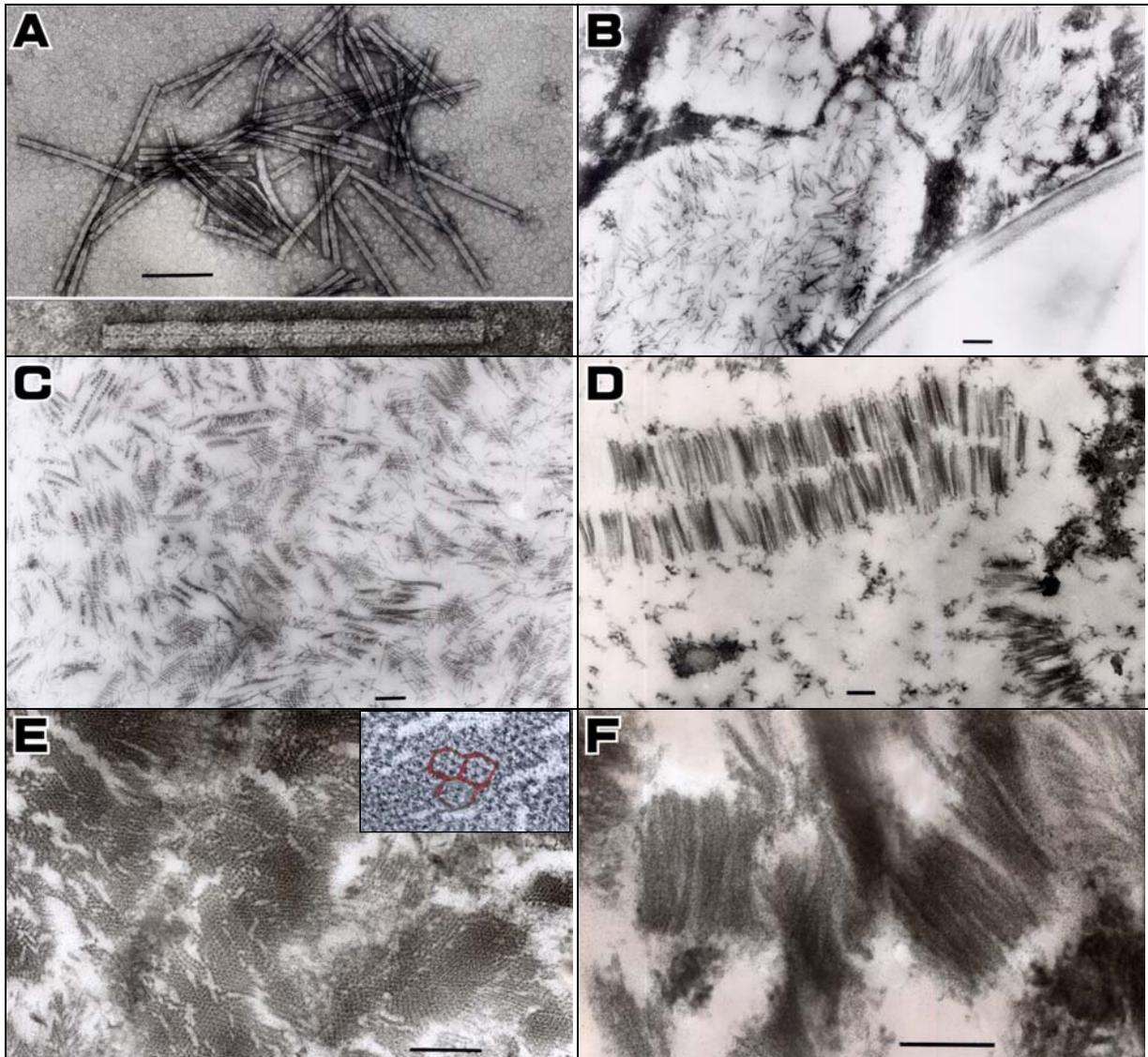
ORSV為Tobamovirus屬的病毒，病毒顆粒呈直桿狀，其長度介於254~346 nm，平均為299 nm，直徑為18 nm(圖五、A)。多數病毒顆粒可觀察到一條明顯之縱溝(central cannal)(圖五、A內插圖)。在觀察的標本中常見長度較短的病毒顆粒，此乃因標本製備過程中常造成病毒顆粒斷裂所致，並非病毒的正常形態。感染ORSV之罹病葉片組織超薄切片中可在細胞質內觀察到病毒顆粒呈不規則分佈(圖五、B)，或呈縱橫交錯狀(圖五、C)，或規則排列成多層柵欄狀(圖五、D)。若橫切病毒聚集處，則可觀察到病毒顆粒聚集成束後的橫切呈六

角稜鏡(hexagonal prism)狀的排列 (圖五、E及圖五、E插圖所示)；若縱切病毒聚集處，則可觀察到病毒顆粒呈片狀排列(圖五、F)，上述證據顯示ORSV的病毒顆粒在細胞內應是聚集成束分佈於細胞內。



圖四、蕙蘭嵌紋病毒(CymMV)顆粒(A 和 B)及罹病組織超薄切片(C-F)電顯圖。A、罹病葵藜葉片粗汁液中的病毒顆粒；B、部份純化之病毒顆粒；C、病毒顆粒呈不規則分佈(蝴蝶蘭)；D、聚集成紡錘狀(*Nicotiana benthamiana*)；E、排列成層狀結晶(葵藜)；F、緊密聚集成堆(紅藜)。

Fig. 4. Electron micrographs of *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) particles and ultrathin sections of CymMV-infected tissues. CymMV particles obtained from crude sap of infected tissue (A) and partially purified preparations (B). A various types of aggregation, such as loose (C), spindle-like (D), stacked (E), and dense (F) aggregations, can be observed in the cytoplasm of infected *Phalaenopsis* (C), *Nicotiana benthamiana* (D), *Chenopodium quianoa*. (E) and *C. amaranticolor* (F).



圖五、齒舌蘭輪斑病毒(ORSV)顆粒(A)及罹病蕙蘭組織超薄切片(B-F)電顯圖。病毒顆粒為直桿狀(rigid-rods) (A)，A 圖內的插圖中明顯可見病毒的鞘蛋白次單位構造及縱溝。罹病細胞內可觀察到病毒顆粒呈不規則分佈(B)，縱橫交錯狀(C)，排成多層柵欄狀(D)。病毒顆粒聚集成束的橫斷面(E)和縱切面(F)可分別觀察到病毒顆粒呈六角稜鏡狀和片狀排列。

Fig. 5. Electron micrographs of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) particles and ultrathin sections of ORSV-infected tissues. Rigid-rod particles of ORSV (A), the helical structure of the capsid subunit and the central canal are clearly shown in the inserted figure. Cytological patterns of virus aggregation can also be observed as irregular distribution (B and C) and stacked layers (D). The cross and longitudinal sections of aggregated virus bundles revealed hexagonal (E) and side-by-side (F) arrangements, respectively.

討 論

蝴蝶蘭在栽培過程中感染病毒是國內蝴蝶蘭產業升級及提升國際競爭力所面臨的一大問題。CymMV和ORSV主要經由機械方式傳播。文心蘭感染病毒除源自組織培養苗外，在栽培過程中由於切花作業頻繁，極易遭受剪切工具等人為感染^(17,22)。蝴蝶蘭感染病毒之最主要途徑可能來自組織培養苗。換言之，來自同一罹病母本之組培苗，其後代即是病毒感染株，在栽培過程中由於品種、栽培環境(溫濕度、日照)及本身營養的條件(肥培管理)等差異都會影響植株的生長勢及影響病徵的表現^(3,17,22)。一批帶病毒之組培苗，在栽培過程中(中株或成株)肉眼判斷為健康植株，然而一旦生長環境因子變遷，如瓶苗移出馴化、或生長環境的溫度上升，往往造成大量植株突然出現病徵，此為感染病毒的真正危機所在。歷來臺灣地區感染蝴蝶蘭的主要病毒為CymMV及ORSV^(3,5)。由於病毒引起的病徵通常極為類似，欲根據病徵以肉眼觀察去判別病毒的種類確有相當的難度。筆者過去兩年餘利用ELISA方法檢測1,150棵經肉眼判視有病毒感染徵狀的蝴蝶蘭植株，發現某些病徵如凹陷壞疽條紋或條紋輪斑(圖二，A、B、C、D)等病徵在紅花系蝴蝶蘭尤易觀察到，似為蝴蝶蘭感染CymMV後的特有病徵。此類病徵或可做為判斷該植株被CymMV單獨感染或與其他種病毒複合感染的參考根據。至於蝴蝶蘭受感染後產生的黃化病徵，其形態、色澤及發生部位均極類似，欲利用此類病徵去辨別其感染的病毒種類(CymMV或ORSV)則相當困難。

電子顯微鏡技術及血清學技術都是較簡易又可靠的病毒鑑定方法，電子顯微鏡技術所涵蓋的陰染法及超薄切片法，都是可資應用的偵測技術。不過因受限於其特定的條件其應用並不如血清學技術普及，但仍不失為一鑑定病毒的利器。蕙蘭嵌紋病毒(CymMV)在植物病毒分類上屬於Flexiviridae科，Potexvirus屬的一種⁽¹¹⁾。本試驗中所觀察的蕙蘭嵌紋病毒顆粒呈略彎曲之長絲狀顆粒，平均長度約484 nm (447~558 nm)，寬度約15 nm。在調查過程中常發現同一絲狀病毒顆粒某些部位寬度較寬(可達17~18 nm)，或許是病毒顆粒在標本製作過程因不明原因所造成，並不是病毒的自然特性。CymMV病毒顆粒呈彎曲狀，彎曲的程度與標本製作有關，試驗結果顯示粗汁液陰染之病毒顆粒彎曲弧度較小，而純化材料陰染之病毒顆粒彎曲弧度較大。此可能亦與標本製備有關，蓋純化過程中經過多次離心聚集和溶液懸浮的程序，導致病毒顆粒易有較大弧度的彎曲，而陰染的顆粒係自生體中釋出後短時間內即進行觀察，未曾經過太多操作過程，故其顆粒較少彎曲，也較能維持其固有形態。有關CymMV病毒顆粒的長度及寬度之報告並不一致^(2,4,6,12,14,20)，Francki (1966)指出病毒顆粒之正常長度為477 nm (450~500 nm)及寬度為13 nm⁽¹³⁾，他認同Brandes and Wetter(1959)所報導之475 nm⁽⁶⁾。在國內，位⁽²⁾報告CymMV病毒顆粒的長度在240~670 nm之間，以450 nm之顆粒最多，寬度約15 nm；周⁽⁴⁾報告CymMV病毒顆粒的長度在300~750 nm之間，以480 nm之顆粒最多，寬度約15 nm。有關CymMV病毒顆粒寬度與長度，不同報告有所差異，例如病毒顆粒寬度國外報告為13 nm^(6,12,13)，而國內均報告為15 nm^(2,4)，但應該都在合理的誤差範圍內。Lessmann and Koenig⁽¹⁹⁾也指出病毒來源、準備步驟、放大工具的刻度(calibration of instrument mag.)、度量的方法、個人度量的誤差等因素都有可能影響度量的結果。有關CymMV感染的罹病組織之超薄切片相

關的研究報導較少⁽¹³⁾。本試驗觀察則顯示在罹病細胞之細胞質內，CymMV病毒顆粒往往呈不規則排列散佈於細胞質內(圖四、C)，或集聚呈紡錘狀排列(圖四、D)，或呈規則層狀結晶排列(圖四、E)。

ORSV在植物病毒分類上屬於*Tobamovirus*屬的一種⁽¹¹⁾。其病毒顆粒為直桿狀，長度約300 nm，寬約18 nm，顆粒中央部有一縱溝(central hollow cavity)，直徑約3.3~3.7 nm，顆粒易脆^(16,20,21)。本試驗在電顯檢視過程中，常會發現部份呈直桿狀之病毒顆粒其直徑約25 nm，這些顆粒究竟是否因染劑穿透或任何其他因素造成，原因不詳。ORSV呈直桿狀及縱溝構造等特性與CymMV之呈彎曲及不易觀察到縱溝構造等特性極易於電顯下辨別。在超薄切片方面，ORSV在罹病細胞質內，其病毒顆粒有呈不規則排列者(圖五、B)、有呈交叉狀排列者(圖五、C)、有呈層狀結晶排列者(圖五、D)，聚集成束的病毒顆粒橫切面則可觀察到六角稜鏡(hexagonal prism)狀的排列(圖五、E)。Paul⁽²⁰⁾指出ORSV通常於接種後數天形成層板狀(stacked plates)結晶，病毒顆粒與層板呈垂直狀，但不易觀察到典型TMV所形成之整齊六角稜鏡(hexagonal prism)狀的排列。不過，本試驗在ORSV感染的莖葉細胞內觀察到該種排列，或許是由寄主種類的差異所致。試驗結果顯示，利用電子顯微鏡觀察罹病組織的超薄切片，可觀察細胞病理層次的變化與病毒感染所引起微觀病徵(microscopic symptoms)，但對於病毒種類之判別與鑑定則無甚助益，應輔以免疫電子顯微鏡技術，如膠金標定(collodion gold labeling)始能達到利用電子顯微鏡診斷鑑定病毒的目的。

參考文獻

1. 中華盆花發展協會 2005 臺灣蝴蝶蘭運銷通路調查報告 p.81。
2. 位國慶 1988 臺灣蝴蝶蘭重要病害發生與調查 臺灣糖業研究所研究彙報 122:31-41。
3. 位國慶 1994 臺灣蝴蝶蘭病毒之發生與防治 p.135-147 臺灣花卉病蟲害研討會專刊。
4. 周廷光 1980 臺灣蘭花毒素病害之研究 中國園藝 26:127-142。
5. 張清安 2005 蘭花病毒病 植物保護技術專刊系列(1) 62pp. 行政院農委會動植物防檢疫局。
6. Brandes, J. and C. Wetter. 1959. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8:99-115.
7. Chen, C. C., W. F. Ko, Y. X. Zheng and F. J. Jan. 2003. Isolation of a tospovirus causing chlorotic and necrosis spots symptoms on moth orchids (*Phalaenopsis* spp.). *Plant Pathol. Bull.* 12:293.
8. Chen, C. C., W. F. Ko, Y. X. Zheng and F. J. Jan. 2005. Isolation and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on *Phalaenopsis* orchids. *Plant Patho. Bull.* 14 : 296.
9. Christie, S. R., D. E. Purcifull, W. E. Crawford and N. A. Ahmed. 1987. Electronmicroscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissue samples with appendices on negative staining techniques. *Fla. Agric. Exp. Stn. Bull. No. 872*, 45 pp.

10. Edwardson, J. R. and F. W. Zettler. 1988. *Odontoglossum ringspot virus*. p. 233-247. In : The plant viruses. Vol. 2. Van Regenmortel, M. H. V., and Fraenkel-Conrat, H. (eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, USA.
11. Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball. 2005. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Virus. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division, International Union of Microbiological Societies. 1259 pp.
12. Francki, R. I. B. 1966. Isolation, purification, and some properties of two viruses from cultivated cymbidium orchids. *Aust. J. Biol. Sci.* 19:555-564.
13. Francki, R. I. B. 1970. Cymbidium mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No.27.
14. Gold, A. H. and D. D. Jensen. 1951. An electron microscope study of *Cymbidium mosaic virus*. *Am. J. Bot.* 38:577-578.
15. Hu, J. S., D. Ferreira, M. Wang and M. Q. Xu. 1993. Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. *Plant Dis.* 77:464-468.
16. Jensen, D. D. and H. A. Gold. 1951. A virus ring spot of *Odontoglossum* orchid : symptoms, transmission and electron microscopy. *Phytopathology* 41:648-653.
17. Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55:53-62.
18. Lawson, R. H. and H. T. Hsu. 1995. Orchid. p.409-420. In: Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops. Loebenstein et. al. (eds.). John Wiley & Sons, West Sussex, United Kingdom, 543 pp.
19. Lesemann, D. E. and R. Koenig. 1977. Potexvirus (Potato Virus X) Group. p.331-345. In: The Atlas of Insect and Plant Viruses. Maramorosch, K. (eds.). Academic Press.
20. Paul, H. L. 1975. *Odontoglossum ringspot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No.155.
21. Shikata, E. 1977. Tobamovirus (Tobacco Mosaic Virus) Group. p.237-255. In: The Atlas of Insect and Plant Viruses. Maramorosch, K. (eds.). Academic Press.
22. Zettle, F. W., N. Y. Ko, G. C. Wisler, M. S. Elliott and S. M. Wong. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74:621-626.
23. Zheng, Y. X., L. C. Weng, C. C. Chen and F. J. Jan. 2005. 2005. Molecular evidence that the virus causing chlorotic spots on *Phalaenopsis* orchids is a new potyvirus. *Plant Pathol. Bull.* 14:296-297 (Abstract).
24. Zheng, Y. X., S. D. Yeh, C. C. Chen and F. J. Jan. 2003. Molecular cloning of a tospovirus infecting *Phalaenopsis* orchids in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 12:294 (Abstract).

Symptomotological and Cytopathological Studies of *Odontoglossum ringspot virus* and *Cymbidium mosaic virus* Infections on *Phalaenopsis* Orchids in Taiwan¹

Ching-Chung Chen², Yuh-Kun Chen³, Wen-Fwa Ko² and Shih-Tsai Yeh²

ABSTRACT

Cymbidium mosaic virus (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) are two most common and economically important *Phalaenopsis* viruses in Taiwan. This article describes the morphology, symptomatology and related cytopathology of CymMV and ORSV. Various types of symptoms, i.e. yellow spots, chlorotic mosaic, vein chlorosis and ringspots with sunken necrotic lines, have been observed on leaves of CymMV-infected *Phalaenopsis*, while only symptoms of systemic chlorosis appeared on the leaves of ORSV-infected orchid plants. CymMV has a particle morphology of flexuous-rod with a size of 484 nm in length and 15 nm in width, while that of ORSV is rigid-rod with a size of 300 nm in length and 18 nm in width. Ultra-thin sections of leaf tissue of CymMV-infected plants revealed different types of particle aggregations, including spindle-shaped, stacked, plate-like, and irregular distributed, in the cytoplasm of infected cells. Except the typical hexagonal arrangement of Tobamovirus in infected cells, types of particle aggregations observed in ORSV-infected cells were similar to that of CymMV. The symptomotological and cytopathological characteristics of CymMV and ORSV described here may provide a reference for differentiating virus infections of *Phalaenopsis* in the field.

Key words: *phalaenopsis* orchid, CymMV, ORSV, symptom, electronmicroscope.

¹ Contribution No. 0654 from Taichung DARES, COA.

² Senior Specialist, Technician and Assistant Researcher, respectively of Taichung DARES, COA.

³ Associate Professor, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University.