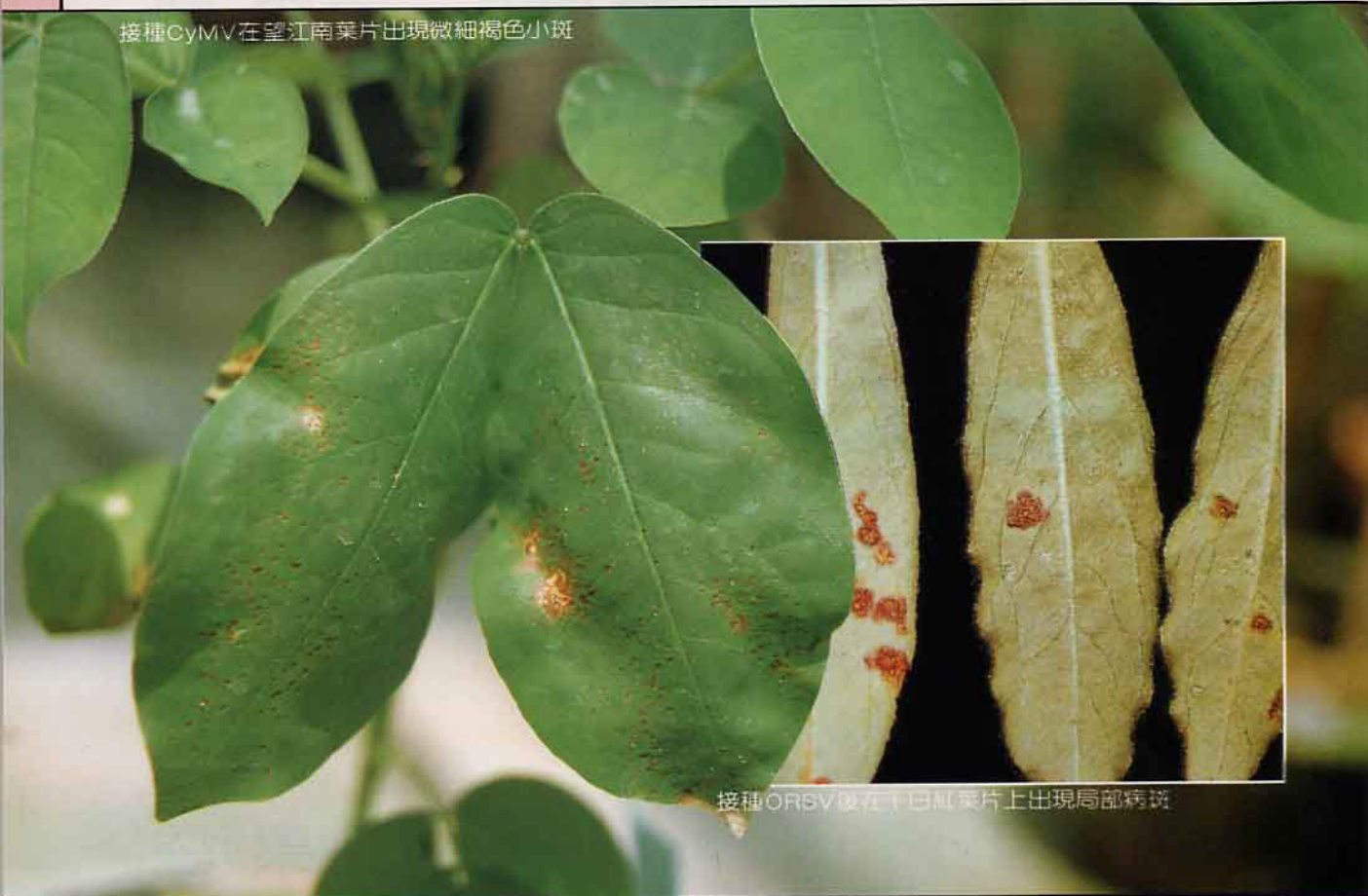


蘭花病毒病之檢定法 (上)

農試所植病系副研究員／張清安

接種CyMV在望江南葉片出現微細褐色小斑



接種ORSV後在百日紅葉片上出現局部病斑



電子顯微鏡下觀察之CyMV細長形病毒顆粒 (陳脈紀教授提供)



光學顯微鏡下觀察之ORSV內含體 (柯南靖博士提供)

為什麼蘭花病毒病害需要檢定？

難道無法依徵狀之判斷而加以鑑別嗎？這是筆者談及蘭花病毒檢定時經常被栽培者質疑之問題。我的答案是由於蘭花感染病毒後並不一定會顯現肉眼可資辨視之徵狀，而且有很多因環境不適，微量元素缺乏或過量，菌類感染，甚至昆蟲叮咬等其他因素也可造成蘭株產生類似病毒病的徵狀，因此為了避免誤診，錯將無病蘭株當成病株丟棄，最好能利用科學方法進行檢定予以確認。

指示植物接種法

科學上常用之病毒檢定方法有4種，此4種方法之優缺點則以列表方式綜合於表1中。其中第一種指示植物之接種法，乃是利用病毒可以感染多種寄主之特性，以人為方式將其接種到比原寄主（譬如蘭花）更敏感更能表現病徵之寄主上，原則上若能找到可以在短時間（如2—3天）內即可顯出特殊具有判別價值病徵之寄主，則此種方法不失為一種快速簡單成本低之方法。但是常常事與願違的，感染植物之數百種病毒中能夠找到符合此項特性的病毒並不多。加上許多病毒根本無法經由人為接種達到傳染目的，自然也就無法採行此種檢定方式了。所幸在蘭花



光學顯微鏡下觀察之CyMV內含體（柯南靖博士提供）

上最常發生之3種病毒CyMV，ORSV及CMV三者均可找到鑑別性寄主（見表2），不過由於影響接種成功與否的因素太多，除非當事人經驗豐富，否則筆者仍然建議應以下將詳述的方法為主要之選擇。

電子顯微鏡觀察法

將可疑病株葉片汁液置於電子顯微鏡下觀察，若有見到病毒顆粒則可確定該植株即為已被感染之病株，以蘭花病毒之CyMV及ORSV為例，其顆粒形態大且容易辨視，利用電顯觀察判別病株簡單易行。但是並非所有病毒均是如此，譬如感染蘭花之CMV，屬球形顆粒，直徑只有28nm，在電顯下顆粒形態不易與寄主之核醣體區別，因此無法利用電顯觀察法進行CMV之檢定。而且影響觀察成功與否之因素很多，採樣數少、病毒濃度不均等都是可能之因素，因此常常面臨觀察之結果看不到病毒顆粒，但卻仍無法斷言該樣本屬無病毒感染之窘境。何況電子顯微鏡造價昂貴必須專人負責操作，因此難以普及化，無法全面應付蘭花業者之需求。

光學顯微鏡觀察法

此法乃1977年由美國佛羅里達大學Christie and Edwardson所發表出來之方

表2 蘭花病毒ORSV, CyMV及CMV之常用指示植物及發病天數

病毒種類	指示植物（學名）	發病天數
ORSV	千日紅(<i>Gomphrena globosa</i>)	5-7
CyMV	望江南(<i>Cassia occidentalis</i>)	2-3
CMV	藜(<i>Chenopodium amaranticolor</i>)	3-4

抗血清檢定法之原理

現行之病毒檢定法中，國際公認可信度最高也最普及的要算是血清檢定法了。不僅農業界如此，連獸醫界甚至人類病毒疾病之診斷更是不作二想。血清檢定法乃是利用病毒（抗原）可以引起動物體對其產生專一性抗體，而抗體可與刺激其產生之抗原結合之原理。科學家將由染病植物上所抽取純化之病毒，注射於動物（大部份利用紐西蘭白兔）體內，使之刺激白兔體內之免疫系統產生對應之抗體，然後將此抗體分離純化出來，則此抗體便能供為檢定病毒感染之試劑，當其與未知感染與否之植株汁液接觸時便可找尋其相對應之病毒立即與之結合，透過此種緊密的結合科學家即可判定原植株是否為病毒感染。此種方法敏感度相當高，一般而言，當每一克植物葉片中含有 10^{-9} 克之病毒時尚能被偵測出來。

法，其主要原理在於利用染色的方法將病毒粒子於寄主細胞中所聚合而成，或者由病毒所合成之蛋白質所聚合而成之內含體（Inclusion body）加以染色區別，使之在光學顯微鏡下能由肉眼加以辨視，再根據不同病毒所形成之特殊内含體之型態及組成份（譬如核酸或蛋白質）加以歸納分析使之成為鑑別病毒之一種依據，此方法之發展主要是為了克服利用電子顯微鏡時所遭遇之不普及與操作不易之缺點。就受過訓練有經驗之操作人員而言，此方法的確省時簡單，但是對一般研究人員而言若無良好之經驗背景，則仍視而不見的可能大有人在。國內此項技術已由國立中興大學柯南清教授大力推展，並將觀察圖鑑編印成冊，有興趣者可逕自參考“簡易病毒診斷圖鑑”一書。

表1 幾種常用植物病毒檢定法優缺點比較

檢定法	優點	缺點
指示植物接種	<ol style="list-style-type: none"> 1. 簡單易操作 2. 2天至3個月 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 費空間 2. 費時間 3. 植物生長狀態影響病徵表現 4. 無適當植物可用 5. 有些病毒無法機械接種
電顯觀察	<ol style="list-style-type: none"> 1. 眼見為憑 2. 10分鐘內可獲結果 3. 敏感度高 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 貴重不易獲得 2. 操作須經驗 3. 球形或小顆粒病毒不易看到 4. 眼不見不敢說沒有
光顯觀察	<ol style="list-style-type: none"> 1. 儀器便宜易取得 2. 操作較電顯容易 3. 1小時可獲結果 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 操作，判斷結果須經驗 2. 某些病毒群不易看到 3. 眼不見不敢說沒有 4. 無法應付多數樣品
血清試驗	<ol style="list-style-type: none"> 1. 敏感度高 2. 專一性高 3. 快速（2天內獲得結果） 4. 可檢定多數樣品 5. 判斷結果不須經驗較客觀 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 血清製作不易 2. 購買血清費用高 3. 專責試驗中心