

蝴蝶蘭病毒之特性及其防治¹

李惠鈴²

摘 要

以雙層抗體直接 (DAS-ELISA) 法調查本省台中及台東兩地區七個蘭園中蝴蝶蘭植株上發生CyMV (Cymbidium mosaic virus)及ORSV (Odontoglossum ringspot virus)的情形，CyMV及 ORSV的感染率分別為41.24%及8.9%。將感染CyMV的蝴蝶蘭葉片小塊浸於0.1 M 磷酸緩衝液(PB)(pH 7.2)中以微波爐50%火力加熱三十秒，即有固定CyMV帶狀內含體的效果，0.1 M PB 中含 0.25% Glutaraldehyde，則可增加固定的效果。蝴蝶蘭在接種 CyMV 或 ORSV 20個月後，以DAS-ELISA 法偵測，在根、葉、花均有病毒存在；以免疫電顯捕捉法偵測，在感染ORSV的花梗芽中，所有頂芽生長點均有病毒存在，側芽生長點則有87.5%帶病毒；感染CyMV者，頂芽生長點20%，而側芽生長點有 30.77%病毒存在。將10個不同品種的蝴蝶蘭分別接種ORSV、TMV(tobacco mosaic virus)、ToMV(tomato mosaic virus)及 CGMMV(cucumber green mottle mosaic virus)等病毒，結果10個品種均可被 ORSV感染，而TMV無法感染每一品種的全部接种植株，ToMV 及 CGMMV皆不造成感染。以 5%NaOH 作為蘭園工具消毒的藥劑，可防止ORSV、CyMV及ORSV與CyMV複合感染之傳播。

關鍵詞：蝴蝶蘭、齒舌蘭輪紋病毒、喜姆比蘭嵌紋病毒、工具消毒。

前 言

蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis spp.*) 屬於蘭科 (Orchidaceae)，其品種眾多，變化豐富，除非經產期調節，否則一般而言，一年只開一次花。目前臺灣蝴蝶蘭的栽培，主要分佈在中部地區的台中、彰化、嘉義地區及原產地的東部地區。品種來源除了自國外引進外，蘭友們更以雜交方法配育出許多新品種。生產方式為盆花及切花，無論那一種生產方式，均有隨國際花卉市場發展而走向規格化、標準化的趨勢，因此組織培養技術勢將成為主要的

¹本文為作者碩士論文之一部份。

²臺東區農業改良場助理研究員。

繁殖方法，而這種繁殖方式提供病毒傳播的最佳途徑，若不事前預防，病毒將在蘭園內造成更多的感染，又切花生產方式不但有利病毒的傳播，且病毒感染影響切花植株生長及切花品質。因此了解蝴蝶蘭病毒的特性，利用各種診斷方法來偵測病毒的感染並研究其防治方法，以提供爾後蝴蝶蘭產業發展的基本資料，是迫切急需的。

感染蘭花的病毒目前已有記載者為24種，其中感染蝴蝶蘭的病毒有CyMV、ORSV、CMV^(28,31,48)、Closterovirus⁽³⁶⁾、Orchid fleck virus及Rhabdoviruses⁽³²⁾等，本省已發現有CyMV、ORSV、及CMV⁽²⁸⁾。自Allison等人(1981)將ELISA應用於CyMV及ORSV以後，此法已普遍運用在CyMV及ORSV的研究上^(14,40,41,45)，目前國內以ELI病毒的發生情形，資料尚屬缺乏。CyMV屬Potexvirus群，經Azure A 染色後，可在感染的細胞內看到紫紅色的內含體，經過5% Glutaraldehyde (GA) 固定兩小時後，以 0.1 M Phosphate buffer (PB, pH 7.2) 水洗後，可保存內含體的形態，而看到帶狀內含體 (Banded inclusion body)⁽²⁹⁾。對於組織之固定，除使用固定劑外，也有利用加熱來固定，早在1898年Ehrlich及Lazarus首次利用加熱固定血管的薄膜之後，即有完備的發展史，配合化學藥劑加入，並以微波爐加熱的固定技術，自1970年由Mayers首創之後，即不斷地被應用於動物組織的研究上^(6,7,19,38,47)。本研究為首次應用此技術於蝴蝶蘭之組織固定。利用生長點的組織培養方法，配合各種的化學處理，是獲得無病毒苗的主要途徑，有關此方面的研究，已有不少報告^(21,22,34,46)。然而，利用生長點而取得蝴蝶蘭的無病毒苗，目前尚缺乏研究，由於國內利用花梗芽進行組織培養的方式極為普遍，因此，瞭解病毒在植株各部位的分佈，可以提供以後生產無病毒苗的重要參考。蘭花上的主要病毒為CyMV及ORSV，皆易以接觸傳染，常因園藝操作藉工具而傳染蔓延。病毒病害目前尚無法治療，因此，減少園中病毒的傳播，成為預防蘭花病毒的基本工作。工具消毒即是杜絕再次傳染最直接、最有效的方法。一般常用的消毒藥劑，其機制是不活化病毒或使病毒喪失感染力，Johnson曾以Agar-disc法選出可以不活化tobacco mosaic virus (TMV)的物質，如牛奶、馬血清、10% Formalin 及 0.1% KOH等，且測出pH值對病毒有效範圍是小於1.5及大於或等於 11.0⁽²⁵⁾。Petegas等人分別以 10% Na₃PO₄、0.26% NaOCl 與 0.01% Ivory Liquid 混合處理修剪工具，可明顯降低 tomato mosaic virus (ToMV)的感染率⁽⁴²⁾。Wisler建議以10%漂白水及飽和 Na₃PO₄浸泡工具數秒鐘，塑膠或素燒盆至少一小時，可除去蘭花病毒⁽⁴⁸⁾。國內目前尚未有利用化學方法消毒蘭園工具的資料，因此，建立適合國內業者的消毒方法，乃是防治病毒不可缺乏的。

本研究旨在應用 DAS-ELISA法、光學及電子顯微鏡的技術，進行調查，以了解本省蝴蝶蘭主要病毒感染情形及其特性，提供國內切花業發展之參考，並偵測病毒在蝴蝶蘭植株的分佈情形，作為無病毒組織培養的參考依據；尋找適當的固定方法以固定CyMV並提高簡易病毒診斷法的準確性；另外，還探討不同品種的蝴蝶蘭對不同病毒的感受性；及尋找適當的化學藥劑消毒工具，以防治蝴蝶蘭的病毒再次傳播。

材料與方法

蝴蝶蘭被感染株病毒之調查

自1989年至1990年間，由台中、台東等地區之主要蘭園，採取疑似病毒感染之葉片，攜回實驗室，以雙層抗體直接法 (DAS -ELISA) 利用齒舌蘭輪紋病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) 及喜姆比蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CyMV) 兩種抗血清做檢查。檢查過程為：以 Coating buffer 將純化之 IgA 稀釋 1000 倍。在微量盤 (microtitre plate) 的每個待測孔槽中各加入 200 μ l 的稀釋 Coating IgG，於 37°C 室溫箱中令其吸附 2 小時。然後以 PBST 水洗 3 次，每次浸 3 分鐘，拽乾後備用。切取採回之葉片及已知感染 CyMV 或 ORSV 的葉片和健康的葉片當對照，以 1:10 (w/v) 的比例，將 0.05 M KPB 加入，研磨成汁液，每個孔槽加入葉片汁液 250 μ l，置於 4°C 中過夜。然後以 PBST 水洗 3 次。每個待測孔槽加入 200 μ l 的 conjugate IgG，在 37°C 室溫下靜置 2 小時。然後再重覆水洗步驟，取以 substrate buffer 配製成的 0.15% B-nitrophenyl phosphate 溶液 (mg/ml)，每個孔槽各加入 200 μ l，在室溫下靜置於黑暗中 15~30 分鐘，直到變成黃色為止。取 50ml 的 3M NaOH 加入每個孔槽，以停止呈色的反應。以 ELISA 讀值機 (MR 700 Dynatech) 在波長 405nm 下測其吸收值。讀值為健康葉片對照組之 2 倍以上者視為正反應。

感染蝴蝶蘭病毒內含體之光學顯微鏡觀察

Calcomine orange-Lurol brilliant green BL 染色法⁽¹⁾：以刮鬚刀片切取葉片下表皮組織薄片，放入含有 8 份 1% Luxol brilliant green，1 份 1% Calcomine orange 及 1 份蒸餾水之小型玻璃皿 (syracuse watch glass，直徑 27mm) 染色 15 分鐘後，吸去染液，以 95% 酒精退染 2~3 秒鐘，隨即吸去酒精，立即加入 2-甲氧基乙醋酸 (2-Methoxyethyl acetate) 處理 10 分鐘，取出已染色完成之材料，置於滴有封埋劑 (LR White) 之載玻片上封片，於光學顯微鏡下觀察。

Azure A 染色法⁽¹⁾：以刮鬚刀片切取葉片下表皮組織薄片，放入 9 份 1.25% Azure A 及 1 份 0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之混合液中，染色 15 分鐘，吸去染液，以 95% 酒精退染 1~3 分鐘，吸去酒精，加入 2-甲氧基乙醋酸處理 10 分鐘，取出材料，以 LR White 封片，在光學顯微鏡下觀察。

CyMV 內含體之固定：(1) 比較 Glutaraldehyde 及 Formalin 之固定效果—以 0.1M 之 phosphate buffer (pB, pH 7.2) 與 25% Glutaraldehyde (GA) 及 37% Formalin，分別配製成 5.0%、2.5%、2.0%、1.0%、0.5% 的 GA 及 37%、18.5%、9.25% 的 Formalin 溶液。以刮鬚刀片切取葉片下表皮組織薄片，分別浸於上述所製備的各溶液中，各固定 30 分鐘、1 小時及 2 小時。以 0.1 M pB 水洗 3 次後，以 Azure A 染色法染色，以光學顯微鏡觀察比較

CyMV內含體被固定後呈現帶狀的效果。(2)利用微波爐加熱固定—將感染CyMV之葉片組織，切成 4×8 mm小塊，浸於含有 0.1M PB (pH7.2)的小玻璃皿中，放在微波爐(White Westing house KM 938)內，以50%，100%的火力，分別加熱10秒、20秒及30秒後，切取表皮以Azure A染色法染色，以光學顯微鏡觀察比較效果。將葉片組織切成 4×8 mm小塊，分別浸於以 0.1M PB配製的0.25%的GA固定液與 0.1M PB中，在微波爐中以50%的火力，分別加熱10秒、20秒及30秒後，切取表皮以Azure A染色法染色，比較其效果。任選12株感染CyMV之蝴蝶蘭植株，同前述取其葉片組織塊，浸於 0.1M PB中，置於微波爐中以50%火力，加熱30秒鐘後，切取表皮用Azure A染色後觀察之。

蝴蝶蘭病毒在植株中之分佈

材料來源：由台東地區購得葉片長約7~8公分的蝴蝶蘭幼苗，分別接種ORSV及CyMV，經20個月後，各取6株調查ORSV及CyMV在根、葉、花及花梗芽等部份之分佈。

(1)ORSV或CyMV在根部之分佈：切取各株2公分長之根尖數條，分別以O-G與Azure A染色及DAS-ELISA法檢查病毒的存在與否。(2)ORSV或CyMV在葉部之分佈由下往上標識，最早生長出來之葉片為第一葉，分別切取每個葉片之葉基、葉身、葉尖三部份組織，分別以O-G與Azure A染色及DAS-ELISA法檢查。(3)ORSV或CyMV在花器之分佈：分別切取每一朵花之花瓣，以DAS-ELISA法檢查。(4)ORSV或CyMV在花梗芽分佈到生長點之情形：利用免疫電子顯微鏡的捕捉法(trapping)(43)先自下而上標識位置，在解剖顯微鏡下剖開各層鱗片，挑取帶2片原葉體之生長點，大小約 0.5mm ，先放在濕潤之濾紙上待檢。取 $5\mu\text{l}$ 的 0.5mg/ml 蛋白質A滴於覆有Formvar支持膜並經碳素補強之銅網上，令其吸附5分鐘後以濾紙吸乾。取 $5\mu\text{l}$ 的抗血清(ORSV為 $1:100(\text{w/v})$ ；CyMV為 $1:10(\text{w/v})$)滴上銅網，令其吸附5分鐘後，以 20mM PBS (pH7.0)水洗20滴後，以濾紙吸除多餘之液體，只留一層水膜在銅網上。吸取 $5\mu\text{l}$ 的生長點汁液，滴在銅網上，令其吸附5分鐘後，以 20mM PBS水洗20滴，去離水子水洗10滴，吸乾多餘液體。以2%醋酸鈾(Uranyl acetate)染色後，在JEOL200 CX電子顯微鏡下觀察。

不同蝴蝶蘭品種對不同病毒之感受性

自台大蘭園購得葉片長約7公分，寬約4公分的蝴蝶蘭苗10個品種(表一)，先以DAS-ELISA法檢查是否感染ORSV、TMV(tobacco mosaic virus)、ToMV(tomato mosaic virus)、CGMMV(cucumber green mottle mosaic virus)等病毒，丟棄感染病毒的苗，健全的苗則置於網室中備用。將備妥之接種源葉片，分別以 $1:10(\text{w/v})$ 比例加入 0.1M PB研磨成汁液，再接種於上述準備之10種不同品種之蝴蝶蘭苗上，每一品種接種3株。接種時，先在蝴蝶蘭葉片撒佈金剛砂，以棉花球沾汁液，塗抹在葉片上，待1分鐘後以清水沖洗葉片

。接種後每隔 2週，切取每一葉片小塊組織，以 DAS-ELISA法檢查各接種的病毒在不同品種蝴蝶蘭中感染的情形。

表一、參試蝴蝶蘭名稱及特性

Table 1. Names and feature of tested materials of *phalaenopsis*

Cultivar	Size and color of flower
1. P.Mount Kaala "NO.1" x P.Paper Moon "No.1"	large, white
2. P. (Musasino - Yukimai) "472" x P. (Musasino - Joseph Hampton) "471"	large, white
3. Dtps.Happy Valentine x P.Zauberrot "dark Pink"	dark pink
4. P.Lippstadt "Elegance" GM/DOG x P.Zauberrot "dark Pink"	dark pink
5. Dtps. (Odoribo x Happy Valentine) "Taida" x P.Zauberrot "dark pink"	dark pink
6. Dtps. (Odoribo x Happy Valentine) x P.Zauberrot "Helga Tiemann"	pink
7. P.Violacea P.Gladys Read "Snow Queen" FCC/RHS x P.Winter Beauty "York" AM/AOS	large, white
8. P.amabilis Var Formosana "#1" x P.At's Kaala	moderate, white
9. P.Gladys Read "Snow Queen" FCC/RHS P.Winter Beauty "York" AM/AOS x P.Joseph Hampton	large, white
10 Dtps City "Chin Yea #8" x P.Grace Lady "Chin - Hwa #2"	white with red center

蘭園操作工具之消毒

以光學顯微鏡法、電子顯微鏡法、生物檢定法及 DAS-ELISA法確定之ORSV單獨感染植株、CyMV單獨感染植株各一株，置網室備用。分別以紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 及望江南 (*Cassia occidentalis*) 為檢驗 ORSV及CyMV之指示植物，進行生物檢查，以氫氧化鈉 (NaOH) 磷酸三鈉 ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、漂白水(Clorox)、PHYSAN 20、白蘭無磷洗

衣粉、白蘭洗潔精爲供試藥劑，所有藥劑以自來水配製成 1%，5%或5%，10%兩種濃度。

工具消毒對 ORSV 感染力的降低效果：取單獨感染ORSV的葉片，以1:5(w/v)比例加入 0.1 M PB研磨，將刮鬚刀片折成兩片使用，浸入粗汁液，取出風乾10分鐘，使病毒殘留在刀片上，再浸於不同濃度之供試藥劑中 1分鐘，取出後以棉花棒沾取刀片上之水液，立即在撒有金剛砂之紅藜葉片上均勻磨擦，1 分鐘後以清水沖洗葉片。以帶病毒之刀片浸入自來水 1分鐘(CK)爲對照。每一處理三重複，記錄局部病斑數。

工具消毒對 CyMV 感染力的降低效果：取單獨感染 CyMV的葉片，以 1:5(w/v)比例加入 0.1 M PB研磨成粗汁液，接種於望江南葉片上，記錄其局部病斑數。

工具消毒對 ORSV 及 CyMV 複合感染力的降低效果：切取等量單獨感染的 ORSV 及單獨感染 CyMV 的葉片組織，以1:5(w/v)比例加入0.1 M PB研磨製成複合感染之粗汁液，分別接種在紅藜及望江南葉片上，記錄其病斑數。

藥劑對 ORSV 及 CyMV 病毒顆粒之影響：(1)將單獨感染 ORSV、CyMV 的葉片，以 1:2.5(w/v)比例加入 0.1 M PB研磨成粗汁液。(2)利用免疫電子顯微鏡的捕捉法 (trapping) 在電子顯微鏡下觀察藥劑對ORSV 及 CyMV病毒顆粒之影響。先將覆有 Formvar支持膜經碳素補強的銅網，分別吸附0.5mg/ml的 Protein A及5 μ l的抗血清，並以 20mM PBS 水洗。(3)將粗汁液與藥劑溶液各取 1滴混合均勻，立刻吸取5 μ l滴於已吸附 Protein A及抗血清之銅網上，令其停留50秒鐘，然後以 20mM PBS水洗20滴，去離子水水洗10滴，再以2%醋酸鈾染色後在電子顯微鏡下觀察。

結 果

感染蝴蝶蘭病毒之調查

由田間採回之蝴蝶蘭挑取外觀不正常的葉片共 324片，分別針對CyMV 及 ORSV兩種病毒，以 DAS-ELISA 法進行檢查，由表一可知，除A、E兩蘭園外，單獨感染 CyMV的比例，分別爲各蘭園的 58.9%、15.09%、64.15%、68%及41.67%；除E、G兩蘭園外，單獨感染 ORSV的比例，分別爲10%、30.77%、11.32%、9.43%及11.0%；而除 A、E、G三園無複合感染之情形發生之外，其餘各園發生 CyMV及 ORSV 複合感染之比例分別爲32.05%、7.55%、5.66%及11%。台中地區蘭園的樣品中，單獨感染CyMV者爲27.63%，單獨感染 ORSV 者有12.3%，而複合感染者爲9.05%。台東地區蘭園樣品中，有54.84%感染CyMV，5.5%爲ORSV所感染，複合感染則爲5.5%。綜合兩地所有樣品的檢驗結果，單獨感染 CyMV 的比例爲41.24%，單獨感染ORSV比例爲8.9%，複合感染者爲7.28%。(表二)

表二. 台中及台東地區蘭園中蝴蝶蘭感染CyMV 及 ORSV之調查

Table 2. Occurrence of CyMV and ORSV infection on *Phalaenopsis* in Taichung and Taitung district

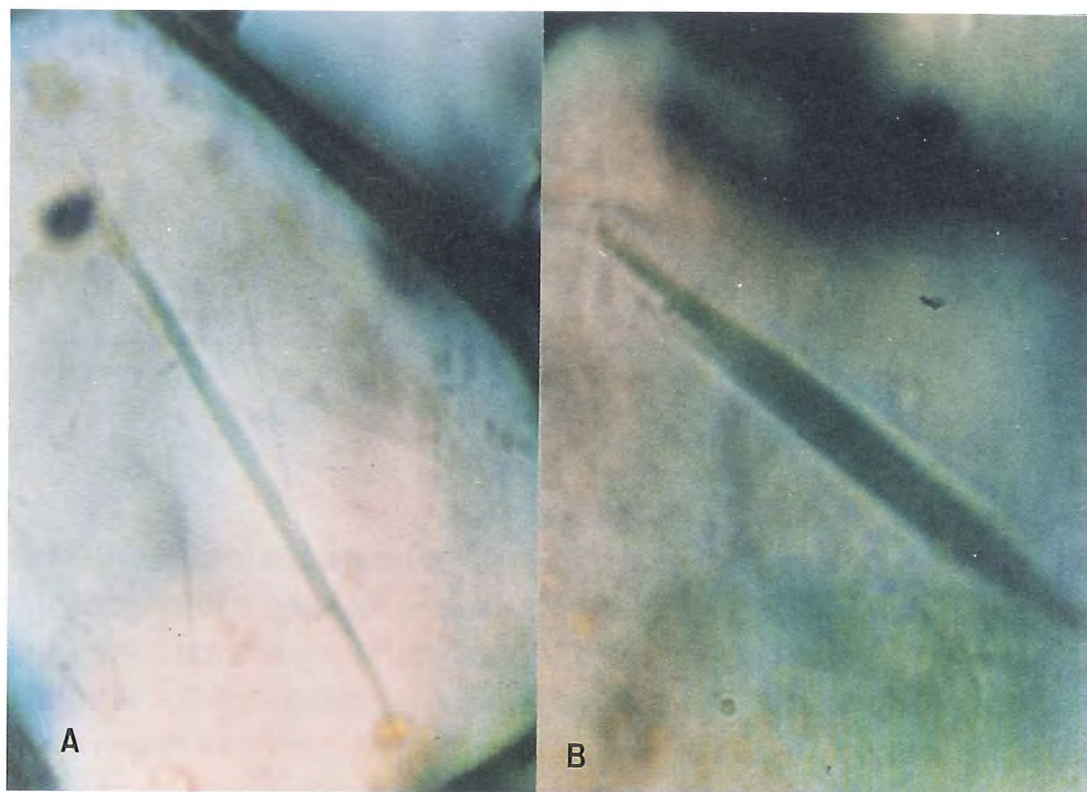
Location	Virus Infection(%)			Total Samples
	CyMV	ORSV	CyMV+ORSV	
Orchid garden				
A	0	10.00	0	10
B	58.90	30.77	32.05	78
C	15.09	11.32	7.55	53
D	64.15	29.43	5.66	53
E	0	0	0	6
F	68.00	11.00	11.00	100
G	41.67	0	0	24
District				
TC	27.63	12.30	9.05	200
TT	54.84	5.50	5.5	124
TC+TT	41.24	8.90	7.28	324

¹A-E are located in Taichung district (TC), F and G are located in Taitung district (TT).

蝴蝶蘭被感染病毒內含體之光學顯微鏡觀察

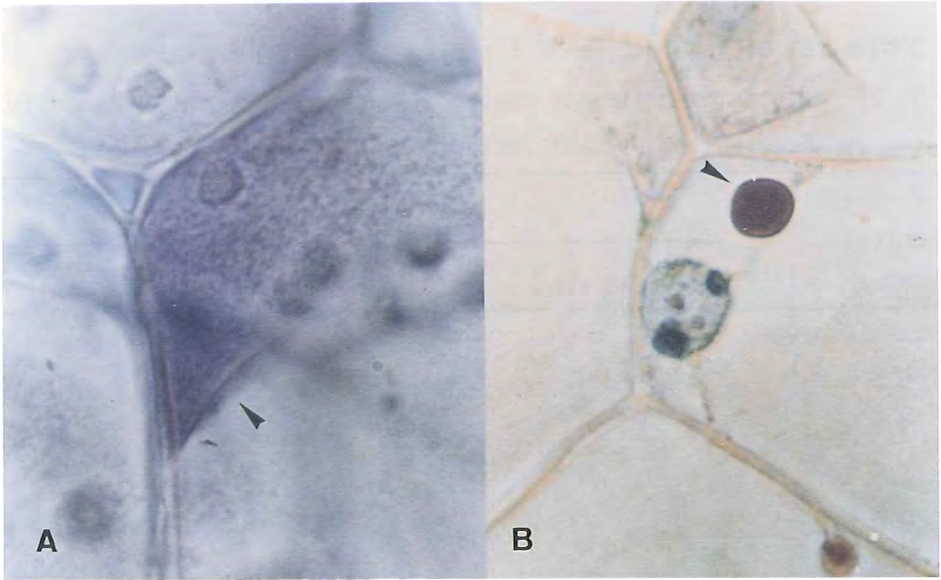
感染 ORSV的葉片組織，經 O-G 染色後，可在細胞中見到被染成橄欖綠色的針狀或紡錘狀的內含體（圖一）。感染 CyMV的葉片組織，經 Azure A 染色後，可見細胞壁邊緣有非典型的紫紅色內含體其形狀有紡錘狀、圓形或近圓形（圖二）。CyMV內含體之固定，分別以不同濃度不同浸泡時間之 Glutaraldehyde 及 Formalin 處理結果，由表三可看出在 2 小時以內，1.0% 以下的 Glutaraldehyde (GA) 全無固定效果；2.0% 在 2 小時始有 7/20 的固定效果（即 20 個內含體中有 7 個被固定到帶狀內含體）。2.5% 及 5.0% 的 Glutaraldehyde 在 2 小時以內均有固定到帶狀內含體，但均以固定 2 小時的效果較高。至於 Formalin 所配成的不同濃度固定液，不論是 4 倍稀釋、2 倍稀釋或原液，在 2 小時之內均無固定帶狀內含體之效果。但從光學顯微鏡觀察中，已可見到比未固定的內含體較為緻密、聚集的內含體。利用微波爐加熱也有固定的效果，先以不同火力及不同時間處理後染色，結果以 100

%火力加熱，10秒鐘即將組織破壞軟化，無法作染色觀察；而50%火力處理者，加熱20秒即有少許的固定效果，而以加熱30秒效果較好，幾乎已達一半之固定效果（圖三），加熱10秒雖無法固定到典型的帶狀內含體，但已可見內含體內有顆粒狀聚集、排列，接近帶狀之情形(表四)。再以0.25%的 Glutaraldehyde比較其促進固定 CyMV內含體的效果，由表五可知加入Glutaraldehyde，以50%火力加熱在20秒時即有增加固定的效果，但被固定的帶狀內含體少，大部份為接近帶狀。任選12株感染 CyMV 的蝴蝶蘭，切取葉片組織塊，浸於0.1 M PB中。置微波爐中以 50%火力加熱30秒鐘後以 Azure A 染色，光學顯微鏡鏡檢，在12株中有10株依此法有固定帶狀內含體的效果，有些固定效果並非很集中，而是分散在幾個相隔離的細胞或較集中某幾個相鄰的細胞。而 2株無帶狀內含體的樣品中，仍可見較緻密的內含體。



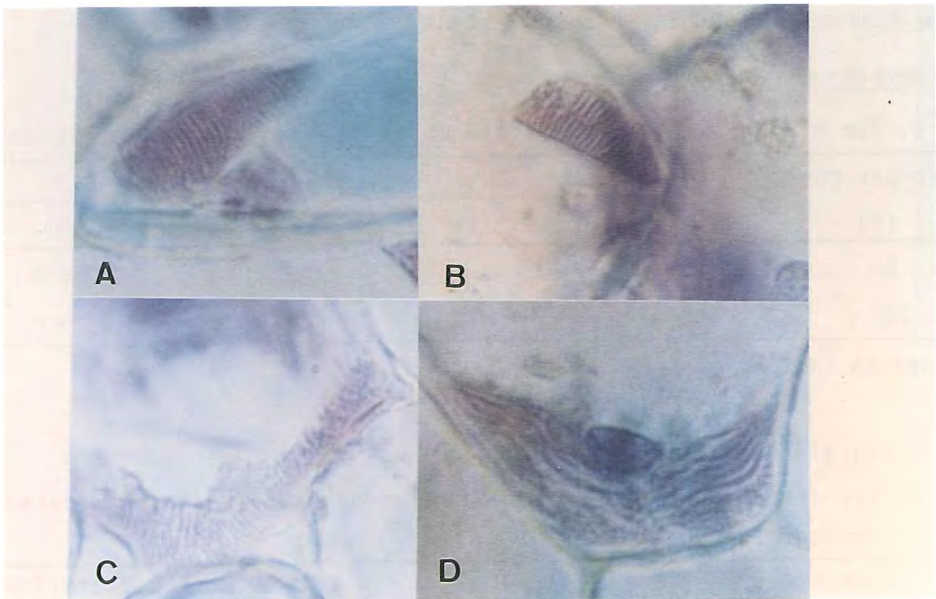
圖一、 ORSV感染蝴蝶蘭後在表皮細胞內產生的大小不同之紡錘狀內含體 (A及B)

Fig.1. Various sizes of paracrystals in *Phalaenopsis* leaf epidermal cells infected with ORSV stained with O-G. (A and B).



圖二、未經固定的蝴蝶蘭葉片組織內所觀察到的不同形狀 CyMV 內含體 (A)不整形 (B)圓形

Fig. 2. Different shapes of CyMV inclusions (arrows) in non-fixed *Phalaenopsis* leaf cells (A)irregular (B)circular.



圖三、(A)、(B)、(C)及(D)感染 CyMV蝴蝶蘭葉片組織經微波爐以50%火力加熱30秒鐘後所固定的帶狀內含體

Fig. 3. (A)、(B)、(C) and (D) CyMV banded inclusions in *Phalaenopsis* leaf cells fixed with 30 sec. microwave irradiation (50% powder).

表三、不同濃度的 Glutaraldehyde 及 Formalin 在不同時間下之固定效果

Table 3. The effects of different concentration of glutaraldehyde and formalin on the fixation of CyMV inclusion at different period

Chemicals	Time		
	30 min	1 hr	2 hr
Glutaraldehyde			
0.5 %	0	0	0
1.0 %	0	0	0
2.0 %	0	0	7/20
2.5 %	1/40	1/40	3/40
5.0 %	2/40	1/40	13/40
Formalin			
9.25 %	0	0	0
18.50 %	0	0	0
37.00 %	0	0	0

¹Ratio = number of banded inclusions / number of total inclusions.

表四、微波爐加熱固定 CyMV 內含體之效果

Table 4. The effects of microwave irradiation on fixation of CyMV inclusions

Microwave power (%)	Time (sec)		
	10	20	30
50	0	3/20 ¹	25/50
100	—	—	—

¹The same as table 2.

表五、Glutaraldehyde 對微波爐加熱固定 CyMV 內含體之影響

Table 5. The effect of microwave irradiation on CyMV inclusion treated with glutaraldehyde

Time (sec.)	0.1 M PB	0.25 % Glutaraldehyde in 0.1 M PB
10	1/40 ¹	3/40
20	3/20	11/20
30	20/40	30/40

¹The same as table 2.

蝴蝶蘭病毒在植株中之分佈：

CyMV或 ORSV在根部之分佈以DAS-ELISA法檢驗結果，全部均為正反應部均為正反應，即在所取得的根尖中，均有 CyMV或 ORSV的分佈。但是以光學顯微鏡觀察經染色的組織，則有些根無法檢查到有CyMV 或 ORSV的內含體（表六）。

表六、Azure A 及 O-G 染色法調查 CyMV 及 ORSV 在不同蝴蝶蘭感染株根部之分佈情形

Table 6. Distribution of CyMV or ORSV in the roots of infected *Phalaenopsis* detected by light microscopy after staining with Azure A or O-G

Root	Ratio of distribution in root	
	CyMV	ORSV
R-1	3/4	0/6
R-2	3/4	0/6
R-3	2/3	1/6
R-4	5/6	4/6
R-5	5/6	2/6
R-6	4/5	3/6

¹R-1 to R-3 : younger roots ; R-4 to R-6 : older roots.

CyMV 或 ORSV在葉組織之分佈以 DAS-ELISA法檢查葉部，結果各部位均為正反應，即無論上位葉或下位葉，葉的基部、中間部份或葉尖，均有 CyMV或 ORSV的分佈。而以光學顯微鏡觀察經染色的葉組織，有些葉片無論葉基、葉身或葉尖，均檢查不到有CyMV或ORSV的內含體；有些葉片本身病毒分佈不均，同一葉片內葉基、葉身、葉尖不一定全部都可檢查到內含體（表七）。從光學顯微鏡觀察中，可看出 ORSV在老葉中的分佈有較新葉多的趨勢。

CyMV或 ORSV在花瓣之分佈經 DAS-ELISA 法檢查感染了CyMV或ORSV之花梗其花上每朵花病毒的分佈情形，每支花梗上的每一朵花的各個花瓣上，均有 CyMV 或 ORSV 的分佈。CyMV或ORSV在花梗芽分佈到生長點之情形經免疫電子顯微鏡之捕捉法檢查接種20個月後的花梗節芽中的生長點，可捕捉到 CyMV或 ORSV存在，在感染ORSV的花梗芽中，全部均有分佈，但愈上面（即愈晚形成）的芽的生長點中，ORSV的量有愈少之傾向；而感染CyMV的花梗芽中，則較沒有規律性，呈現不均勻分佈（表八）在所檢測的芽當中，感染ORSV者，其頂芽帶病毒率為100%，側芽平均為87.5%；而接種CyMV者，頂芽帶病毒率為20%，側芽則為30.77%。

表七、Azure A 或 O-G 染色後以光學顯微鏡檢查CyMV及ORSV在葉部之分佈

Table 7. Distribution of CyMV or ORSV in different part of infected *Phalaenopsis* leaves detected by light microscopy after staining with AzureA or O-G

Order of leaf ¹	Ratio in detected leaf ²					
	CyMV			ORSV		
	base	middle	tip	base	middle	tip
1st	5/6	4/6	4/6	5/6	5/6	5/6
2nd	3/5	3/5	4/5	4/6	5/6	5/6
3rd	0/2	2/2	1/2	5/6	4/6	5/6
4th	1/1	1/1	1/1	1/4	3/4	3/4
5th				3/3	2/3	3/3

¹Counting from base to top.

²Six plants were detected ; blank means no leaf available for being detected.

表八、以捕捉法檢查 CyMV 或 ORSV 在花梗芽的生長點中存在之情形

Table 8. Presence of CyMV or ORSV in the meristem of peduncle buds by trapping

Order of buds ¹	Virus localization ²			
	CyMV		ORSV	
	Ratio	%	Ratio	%
1st	1/1	100	3/3	100
2nd	2/4	50	5/5	100
3rd	0/5	0	5/5	100
4th	2/5	40	3/4	75
5th	0/3	0	2/3	66.67
6th			1/1	100
Top bud	1/5	20	1/1	100
Lateral buds	4/13	30.77	14/16	87.5

¹The same as table 6.

²Five plants were detected.

不同蝴蝶蘭品種對不同病毒之感受性

10個不同蝴蝶蘭品種在接種 2週後，對ORSV及TMV的感染尚有差異，但在4週後，每一品種均可測到所接種的 ORSV及TMV。接種7週後，接種 ORSV的每一品種的每株重複，均可測到 ORSV；接種 TMV的各品種，則每一品種至少有一株可被 TMV感染(表九)。接種 ToMV 及 CGMMV的各品種，在接種2、4、7 週後，均測不到原接種病毒。在所有可測到 ORSV、TMV 的蘭株中，於接種病毒 7週後，均尚無病徵出現。

表九、不同蝴蝶蘭品種對 ORSV 及 TMV之感受性

Table 9. Susceptibilities of various *Phalaenopsis spp.* to ORSV and TMV detected by DAS-ELISA

Cultivar ¹	Ratio of detection					
	ORSV			TMV		
	2wk ² .	4wk.	7wk.	2wk.	4wk.	7wk.
1	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2	1/2
2	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3
3	1/3	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3
4	0/3	3/3	3/3	3/3	1/3	2/3
5	2/3	3/3	3/3	0/3	2/3	3/3
6	0/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3
7	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3
8	3/3	2/3	3/3	2/3	1/3	1/3
9	2/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3
10	2/3	3/3	3/3	2/3	2/5	3/3

¹All cultivars provided by Taida Orchid as table 1.

²Time after inoculation.

工具消毒降低 ORSV 及 CyMV 的感染力

工具消毒降低 ORSV、CyMV及複合感染感染力之效果：經ORSV，CyMV及兩者複合感染的粗汁液污染過的刀片，浸入各藥劑或清潔劑中 1分鐘後，其感染力降低之效果，由表中可以看出，5% NaOH 可使ORSV或CyMV或兩者複合感染之感染力完全喪失，但5%NaOH會造成指示植物接種葉片上產生藥害。5% Clorox可使刀片上殘留的 ORSV及 CyMV之感染力喪失，而在複合污染情形下，均降至1個局部病斑，5% Clorox也會引起指示植物輕微的

藥斑。5% Physan 20 可使單獨污染或複合污染的 CyMV 之感染力喪失；並使單獨污染的 ORSV 感染力降為 2 個病斑，使複合污染的 ORSV 之感染力降為 1 個病斑。5% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 可使單獨污染的 CyMV 感染力降為無病斑，使複合污染的 CyMV 感染力降為 2 個病斑，10% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 對 CyMV 的感染力如同 5% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，但對單獨污染的 ORSV 感染力可降為 2 個病斑，對複合污染的 ORSV 則降至 7 個病斑，1% 及 5% 的白蘭無磷洗衣粉不僅無法使任何一種污染方式的感染力完全喪失，且會造成指示植物輕微藥害。1% 的白蘭洗潔精亦無法使任何一種污染方式的 CyMV 或 ORSV 感染力降至無病斑。5% 的白蘭洗潔精只可使複合污染的 CyMV 感染力降為無病斑，對其他的污染方式則否。

藥劑對 ORSV 及 CyMV 病毒顆粒之影響：在 5% NaOH 及 10% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 處理下，均看不見病毒顆粒。以 1% Physan 20 處理 CyMV，尚可看見極少數的病毒顆粒，但與 CK 並無明顯差別（圖四），由於 1% Physan 20 在工具消毒防治 ORSV 未達理想效果，故沒有測試。

討 論

利用已廣泛運用的 DAS-ELISA 法，調查本省台中、台東兩地區七個蘭園的蝴蝶蘭，其感染 CyMV 及 ORSV 的情形，由調查結果顯示，除 A、E 兩個蘭園之外，其他均以 CyMV 的感染率高於 ORSV。由全部 324 株樣品分析，CyMV 感染率為 41.24%，ORSV 為 8.9%，複合感染為 7.28%，由病徵難以明顯辨別是否感染病毒或感染何種病毒，而經由 DAS-ELISA 調查後追蹤原採樣的病葉，可知感染 CyMV 者，通常引起較明顯的病徵，如黃化條斑、凹陷、壞疽等現象，而 ORSV 大多不造成明顯病徵，僅少數有輕微褪色。這些情形與前人研究^(23,41,49,52) 大致相同，但與柯氏⁽²⁾ 對台灣蘭花病毒的發生調查有異，這可能因採樣的材料不同。本試驗採樣時，只限於以外觀異於正常生長植株的葉片為採樣對象，因此，很可能遺漏了不表現病徵的 ORSV 感染株。由此更可確定蝴蝶蘭病毒病害，正如其他病毒病害一樣，不能以病徵作為診斷依據。

經 O-A 及 Azure A 染色後，以光學顯微鏡觀察感染 ORSV 及 CyMV 的細胞，分別可看到橄欖綠色紡錘狀或針狀內含體及紫紅色的不規則內含體，與前人研究相同⁽³⁾。但有些非感染 ORSV 及 CyMV 的葉片，經 O-G 或 Azure A 染色後，可在細胞內觀察到不同的內含體，與 Vanilla 上的 Potyvirus⁽³⁾ 類似；另有些葉片細胞內可發現在核內、外有橄欖綠色圓形的物質，類似感染 Brassia 的 Rhabdovirus⁽³⁾。非 ORSV、CyMV 感染的病葉中，經 Azure A 染色後，有的在核內發現有紫藍色似內含體的物質；有的在核外有紫紅色，內有空泡的似內含體，目前尚待進一步鑑定其種類。這些經 DAS-ELISA 法測過，在讀值判別上屬於負反應或正負反應之間的樣品，經染色後可發現內含有類似病毒內含體的物質，可見光學顯微鏡

法在病毒的診斷及鑑定上，仍有許多研究的空間。而當有大量材料時，ELISA法不失為省時、快速且準確度高的檢查方法，但少數讀值判別有疑異或其他病毒的感染時，則須賴其他診斷、鑑定技術，如光學及電子顯微鏡、生物檢定法等。

CyMV屬Potexvirus，未經固定而以Azure A 染色法染色後，可見其非典型內含體，正如前人所作，除少數外，大多CyMV的內含體需經固定劑固定，才能見到帶狀內含體，^(3.27)。柯氏曾以 0.1 M PB 配製成 5% Glutaraldehyde 固定液，固定CyMV感染組織 2小時後，可經Azure A染色後看到帶狀內含體，但仍有部份內含體未被固定成帶狀^(3.27)。本實驗試以縮短固定時間，降低濃度，在2小時內，分別比較 30分鐘、1小時及2小時的固定效果，

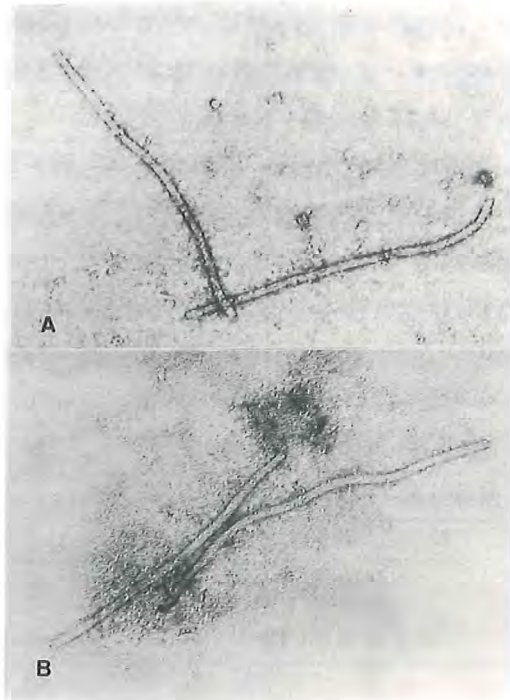
表十、工具消毒對 ORSV 及 CyMV 感染力之影響

Table 10. Effects of chemical treatments on infectivity of ORSV and CyMV

Treatments	No. of locallesin on index plant ¹		
	ORSV	ORSV+CyMV	CyMV
1. CK2	426	189+7	67
2. 1 % NaOH	8	1+1	0
3. 5 % NaOH	0	0+0	0
4. 5% Na ₃ PO ₄ · 12H ₂ O	32	20+2	0
5.10% Na ₃ PO ₄ · 12H ₂ O	2	7+2	0
6. 1 % Clorox	2	9+7	2
7. 5 % Clorox	0	1+1	0
8. 1 % Physan 20	14	16+2	10
9. 5 % Physan 20	2	1+0	0
10. 1 % Granule Detergent (dephosphorous)	61	86+4	6
11. 5 % Granule Detergent (dephosphorous)	9	4+1	2
12. 1 % Liquid Detergent	88	52+1	4
13. 5 % Liquid Detergent	7	19+0	1

¹NO. of local lesion was determined on *Chenopodium amaranticolor* for ORSV and *Cassia occidentalis* for CyMV .

²Contaminated razor blades treated with tap water as check.



圖四、CyMV病毒顆粒以1%Physan 20處理一分鐘之情形 (A)對照不處理 (B)處理過之顆粒
 Fig. 4. The particles of CyMV treated with 1% physan 20 for 1 min , (A) Ck (B) treated with 1% physan 20.

仍可看出 2.0%為有固定效果的最低濃度，且只在2小時才有固定效果。2.5%及 5.0%在30分鐘至2小時之間均可固定到 banded inclusion，但以 2小時的效果最好。以Formalin作相同時間處理，分別以其原液(37.0%)、2倍稀釋(18.5 %)及4倍稀釋 (9.25%)液作為固定處理，比較 2小時內的固定效果，發現均無法固定到banded inclusion，但大部份內含體較未固定過者緻密。由於 Formalin在2小時之內均無固定效果，故不宜代替glutaraldehyde作為CyMV內含體的固定液。利用熱來作固定，早在1898年即由 Ehrlich及Lazarus開始發展，在1970年 Mayer首次利用微波爐加熱固定動物組織之後⁽¹⁹⁾，微波爐固定組織的研究便不斷推進，配合原有慣用的固定劑，不但可以縮短固定時間，也可良好地保存組織的微細構造^(7,19,39,47)，但大多運用於動物組織材料的固定。本實驗則首次試以微波爐加熱來固定CyMV內含體。首先以0.1M PB 浸泡感染CyMV組織塊作為均勻傳熱之導體，在微波爐中加熱，初試不同的火力及時間之固定效果。由表三可知以 50%火力加熱最佳，此與 Van Dort等人⁽⁴⁷⁾的建議符合，50%火力加熱至第20秒鐘即有固定效果，而以30秒鐘固定效果最好，可達 50%固定，且 banded inclusion雖數量不多，但與處理0.1MPB者效果相較，則

前者較佳。以 0.25%GA 加以浸液，在 20 秒時即可提高固定效果，此又與 Hopwood⁽¹⁹⁾、Anthony⁽⁶⁾、Login^(38,39)等人，利用微波熱能配合醛類的應用而達到良好保存組織構造的結果相同，因此，微波爐加熱可應用於植物病毒CyMV內含體的固定，而加入glutaraldehyde則提高固定效果，此為國內外首次報告。

自從 1964年 Morel成功地自感染 CyMV的 *Cymbidium*上取下生長點，經組織培養而得無病毒蘭苗之後⁽³⁴⁾，切取蘭花的分生組織作組織培養，成為栽培者或研究人員得到無病毒蘭苗的途徑。因此瞭解病毒在蘭花植株內的轉移及分佈有其必要性及重要性，根據前人研究可知，感染 CyMV及ORSV有機會以生長點組織培養而得到無病毒蘭苗^(22,46)，且切取的生長點大小關係存活率高低及無病毒苗的成功^(22,34)。本試驗以感染CyMV及ORSV的蝴蝶蘭為對象，分別以光學顯微鏡法、DAS-ELISA法及免疫電顯法偵測這 2種病毒在蝴蝶蘭植株中的分佈，以作為無病毒生長點組織培養之參考。以 DAS-ELISA法偵測，可知 CyMV及ORSV在根尖、葉的葉基、葉身及葉尖及花器，都有病毒存在。以光學顯微鏡法檢查，ORSV所感染的植株，較老的根尖比較新鮮的根尖，容易檢查到 ORSV；在CyMV 感染的植株中，則不論新舊根，均可檢查到CyMV的內含體。以光學顯微鏡檢查葉的三個部位，發現病毒的分佈並不均勻，有些葉片雖已感染（DAS-ELISA測知），但檢查不到內含體。此可能與取樣的部位有關，也可能因病毒的濃度較低，無法聚集而成可見的內含體。以DAS-ELISA法檢查花的每一花瓣，接種20個月的花器中，已有病毒全面分佈，但接種2個月開的花，同樣以DAS-ELISA法偵測，卻測不到有病毒反應，可見病毒的移動，在2個月內尚無法到達花器，而在 20個月後，已可移動至花器中。最重要的應是病毒在花梗芽生長點中存在的情形，因為這是目前取得分生組織作大量繁殖無病毒的主要部位，以免疫電顯捕捉法⁽⁴³⁾測得接種20個月後的花梗芽中，感染 ORSV的花梗芽中，頂芽感染率為100%，側芽為87.5%；感染CyMV的花梗芽中，頂芽感染率為20%，側芽感染率為 30.77%。雖自下而上，生長點中的病毒顆粒數量有漸減之傾向，但ORSV仍可在頂芽中存在；CyMV則於大部份頂芽測不到病毒顆粒，這種結果與 Lawson、Hearon⁽³⁴⁾及 Toussaint等人⁽⁴⁶⁾所作，以切片觀察病毒存在位置的結果頗為符合，這也顯示蝴蝶蘭感染ORSV者，較不易以取生長點組織培養方式獲得無病毒苗，此結果與其他蘭花如 *Cymbidium* 一樣⁽⁴⁶⁾；而 CyMV在頂芽分佈較少，以生長點取得繁殖無病毒的機會較高。

前人以病徵表現，探討有關蘭花品種、對病毒的感受性^(31,33,40)，發現病徵並不足以判斷病毒的感染與否，且不同病毒影響病徵表現也不同，因此，欲瞭解蘭花品種對病毒感染的反應，須用適當之偵測方式。蝴蝶蘭品種眾多，本試驗挑選一般市場較受歡迎的大白花、粉紅花、中白花、白花紅心等10個品種，接種與 ORSV同屬 tobamovirus群，而在園藝作物上較常見的 TMV、ToMV及CGMMV，與 ORSV共同比較，觀察不同品種蝴蝶蘭對這些病毒的感受性。由表九可以明顯看出，在接種後 7週內，這10個品種蝴蝶蘭，任何葉片內均無

法測到 ToMV 及 CGMMV，即 ToMV 及 CGMMV 對這 10 個品種蝴蝶蘭均不造成感染。接種 ORSV 後 7 週，在每一品種的植株中，均可測到 ORSV，感染率為 100%，接種 TMV 者，在接種後 7 週內，雖然有些重複植株在每次偵測時不一定都有病毒反應，但每一品系在接種 7 週後，均有 30% 的感染率，這可能與 TMV 在蝴蝶蘭植株內的移動有關。Corbett 曾發現 TMV 可感染 *Cattleya* 但不能系統性的移動⁽¹³⁾；Lawson 及 Brannigan 也曾以 TMV 接種 *Cattleya* 卻無法從接種葉再單離出 TMV⁽³²⁾。可見 TMV 在蘭花上的移動，受寄主範圍的限制，而這種關係，似與基因遺傳控制有關⁽³⁾，因此探討與病毒移動有關的遺傳因子而加以改變基因，可能成為防治蘭花病毒的途徑之一。又由結果顯示，接種 7 週後，所有植株均尚無病徵表現，故欲診斷蝴蝶蘭感染病毒情形，無法以病徵判斷，亟需藉助有效的診斷方法。

利用鹼性的化學藥劑或清潔劑可降低病毒的感染率^(42,48)。感染蝴蝶蘭的重要病毒 CyMV 及 ORSV，均易藉汁液，接觸而傳播，因此，工具消毒即在斷絕此一傳播途徑。本試驗選取市面上易購得之藥劑及清潔劑，對其不活化 CyMV 及 ORSV 之效果作一比較，發現 5% NaOH 是所有的藥劑中效果最穩定也最好者，對 ORSV、CyMV 及複合感染者，均可在工具消毒 1 分鐘後即消失感染力。其他藥劑對單獨感染的降低感染率也有部份效果，如 1% NaOH、5% 及 10% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、Clorox、5% Physan 20 對 CyMV 單獨感染者及 5% Clorox 對單獨感染 ORSV 者均有降低至無病斑的效果，但蝴蝶蘭中，CyMV 與 ORSV 複合感染的比例亦不小，且 ORSV 較 CyMV 穩定且分佈更均勻，因此，在防治上可考慮對 ORSV 有效的工具消毒藥劑為選擇對象。一般認為洗衣粉或洗潔精可以不活化病毒，但由本試驗得知，在 1 分鐘內，此 2 種清潔劑並沒有理想的防治效果。而 10% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1% Clorox 及 5% Physan 20，可以嘗試以延長處理時間或作混合處理之組合而求得更進一步的防治效果。雖然 NaOH 會引起葉部藥害，但是如果藥劑處理過之用具，以清水沖洗之即可避免。而從電顯觀察藥劑對病毒顆粒的影響，不易看出有明顯的外觀變化，5% NaOH 及 10% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的處理均不見病毒顆粒，可能已被分解。綜上所述，建議 5% NaOH 作工具消毒，並用清水洗淨。以 5% Clorox 延長浸泡時間應可達到效果。而藥劑間的組合、重複浸泡有效次限及使用的便利性改進，則還需更進一步試驗探討。

誌 謝

承蒙台灣省農業試驗所黃秋雄博士、張清安博士、煙試所蔣汝國技正、種苗繁殖場楊佐琦先生及亞蔬 Dr. S.K. 提供接種源及抗血清，謹此一併致謝。

參 考 文 獻

- 1.周廷光 1980 臺灣蘭花毒素病之研究 中國園藝 26:127-142。
- 2.柯南靖 1982 臺灣 *Odontoglossum* 輪斑病毒之發生與鑑定 中華蘭藝 5:319-331。
- 3.柯南靖 1989 簡易植物病毒診斷圖鑑 109 頁 國立中興大學植物病理學系。
- 4.謝式垚鈺 韓又新 1975 臺灣發生之喜姆比蘭嵌紋毒素病 中國園藝 21:292 -298。
- 5.Allison, A. V., E. B. Adams, and L. Steinagel. 1981. Enzymelinked immunosorbent assay as a rapid method for screening for the presence of *Cymbidium* mosaic virus and *odontoglossum* ringspot virus. *Phytopathology* 71:103.
- 6.Anthony , S. Y., M. E. D. Leony , and J. Milions. 1985. Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy.*Journal of Pathology* 146:313-321.
- 7.Bernard, G. R. 1974. Microwave irradiation as a generator of heat for histological fixation. *Stain Tech.* 49:215-224.
- 8.Bodnaruk, W. H., G. R. Hennen , and R. W. Zettler. 1978. Applicability of immunodiffusion techniques in detecting *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ringspot viruses in orchids. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 47:1113-1116.
- 9.Chee, W. W., and A. Allison. 1981. A comparison of 3 enzymelinked immunosorbent assay techniques for sensitivity in detecting virus antigen. *Phytopathology* 71:103-104. (Abstr.)
- 10.Christie, R. G., and J. R. Edwardson. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. No. 9.* 155 pp.
- 11.Christie, R. G., and J. R. Edwardson. 1986. Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. *Plant Dis.* 70:273-279.
- 12.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.
- 13.Corbett, M. K. 1967. Some distinguishing characteristics of the orchid strain of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 57:164-172.
- 14.Dore, I., E. L. Dekker, C. Porta, and M. H. V Van Regenmortel. 1987. Detection by ELISA of two tobamoviruses in orchids using monoclonal antibodies. *J. Phytopathol.* 120:317-326.
- 15.Edwardson, J. R., and R. G. Christie. 1978. Use of virus induced inclusions in classification and diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathology* 16:31-55.
- 16.Edwardson, J. R., and F. W. 1986. *Odontoglossum* ringspot virus. In *The Plant*

- Virus, vol. 2, p. 234-247. Van Regenmortel and Heinz, Plenum Publishing Corporation.
17. Ehrlich, J. A., and J. H. Tremaine. 1977. Physical, chemical, and serological properties of Cymbidium mosaic virus. *Phytopathology* 67:43-49.
 18. Hamilton, R. I., and Valentine, B. 1984. Infection of orchid pollen by *Odontoglossum* ringspot virus and Cymbidium mosaic virus. *Can. J. Plant Pathol.* 6:185-190. (Abstr. from Dialog).
 19. Hopwood, D., G. Coghill, J. Ramsay, G. Milne, and M. Eerr. 1984. Microwave fixation: its potential for routine techniques, histochemistry, immunocytochemistry and electron microscopy. *Histochem. J.* 16:1171-1191.
 20. Inouye, N. 1979. Serological diagnosis method for Cymbidium mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus in orchids. *Nogaku Kenkyu* 56:1-13. (Abstr. from Dialog).
 21. Inouye, N. 1983. Effect of antiserum treatment on the production of virus-free Cymbidium by means of meristem culture. *Nogaku Kenkyu* 60:123-133. (Abstr. from Dialog).
 22. Ishii, M. 1974. Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explant culture. *Acta Hortic.* 36:229-233.
 23. Ishii, M., and A. P. Martinez. 1973. Significant orchid disease in Hawaii. *Hawaii Orchid Journal* 2:6-10. (Abstr. from Dialog).
 24. Jensen, D. D. 1951. Mosaic or black streak disease of Cymbidium orchids. *Phytopathology* 41:401-414.
 25. Johnson, J. 1941. Chemical inactivation and the reactivation of a plant virus. *Phytopathology* 31:679-701.
 26. Kitajima, E. W., A. Blumenschein, and A. S. Costa. 1974. Rodlike particles associated with ringspot symptoms in several orchid species in Brazil. *Phytopath. Z.* 81:280-286.
 27. Ko, N. J. 1985. Cytological methods for the detection, identification, and characterization of orchid viruses and their inclusion bodies. Ph. D. Dissertation, Univ. of Florida. 83 p.
 28. Ko, N. J. 1988. Cytological identification of cucumber mosaic virus infecting *Phalaenopsis*. *Proc. Natl. Sci. Counc. B.R.O.C.* 12:46-51.
 29. Ko, N. J., F. W. Zettler, and G. C. Wisler. 1985. A simplified bioassay

- technique for *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ringspot viruses. Amer. Orchid Soc. Bull. 54:1080-1082.
- 30.Ko, N. J., F. W. Zettler, J. R. Edwardson, and R. G. Christie. 1985. Light microscopic techniques for detecting orchid viruses. Acta Hort. 164:245-253.
- 31.Kobayashi, R. S., and H. Kamemoto. 1989. Inheritance of floral necrosis in *Dendrobium* induced by *Cymbidium* mosaic virus. HortScience 24:499-500.
- 32.Lawson, R. H., and M. Brannigan. 1986. Virus diseases of orchids. pp. 2-49 In: Amer. Orchid Soc. Handbook in orchid pests and diseases. Amer. Orchid Soc., Inc., West Palm Beach, Florida.
- 33.Lawson, R. H., and S. S. Hearon. 1973. Symptomatology of *Cattleya* mericlones infected with *Cymbidium* mosaic virus. Amer. Orchid Soc. Bull. 42:1071-1074.
- 34.Lawson, R. H., and S. S. Hearon. 1974. Distribution and staining properties of *Cymbidium* mosaic virus in bud of *Cattleya* orchid. Acta. Hort. 36:195-206.
- 35.Leong, A. S. Y., M. E. Daymon, and J. Milios. 1985. Microwave irradiations as a form of fixation for light and electron microscopy. J. Pathol. 146:313-321.
- 36.Lesemann, D. E. 1977. Long, filamentous virus-like particles associated with vein necrosis of *Dendrobium phalaenopsis*. Phytopath. Z. 89:330-339.
- 37.Lesemann, D., and S. Doraiswamy. 1975. Bullet-shaped virus-like particles in chlorotic and necrotic leaf lesion of orchids. Phytopath. Z. 83:27-39.
- 38.Login, G. R., and A. M. Dvorak. 1988. Microwave fixation provides excellent preservation of tissue, cells and antigens for light and electron microscopy. Histochem. J. 20:373-387.
- 39.Login, G. R., W. B. Stavinoha., and A. M. Dvorak. 1986. Ultrafast microwave energy fixation for electron microscopy. J. Histochem. Cytochem. 34:381-387.
- 40.Pearson, M. N., and J. S. Cole. 1986. The effects of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus in the growth of *Cymbidium* orchids. J. Phytopathol. 117:193-197.
- 41.Pearson, M. N., and S. P. Pone. 1988. *Viruses* of *Vanilla* in Tonga. Aust. Plant Pathol. 17:59-60. (Abstr. from Dialog).
- 42.Petegas, K. G., A. G. Schuerger., and C. Wetter. 1989. Management of tomato

- mosaic virus in hydroponically green pepper (*Capsicum annuum*). Plant Dis. 73:570-573.
43. Shukla, D. D., and K. H. Gough. 1979. The use of protein A from *Staphylococcus aureus*, in immune electron microscopy for detecting plant virus particles. J. Gen. Virol. 45:533-536.
44. Thornberry, H. H., and M. R. Phillippe. 1964. Orchid disease : Cattleya blossom brown necrotic streak. Plant Dis. Repr. 48:936-940.
45. Toussaint, A., and J. Albouy. 1982. Application of the immunoenzyme method for the detection of two viruses in Cymbidium plants of different ages. Agronomie 2:901-903.
46. Toussaint, A., Dekegel, D., and Vanheule, G. 1984. Distribution of Odontoglossum ringspot virus in apical meristems of infected Cymbidium cultivars. Physiol. Plant Pathol. 25:297-305.
47. Van Dort, J. B., W. C. De Bruijn, C. T. W. M. Schneijdenberg, M. E. Boon, and L. P. Kok. 1988. Preservation of structure and cytochemical reactivity at the ultrastructural level, using microwave irradiation. Histochem. J. 20:365-372.
48. Wisler, G. C. 1989. The Complete Guidebook. How to Control Orchid Viruses. G. C. Wisler. Maupin House Pub., Gainesville FL, U.S.A. 155 pp.
49. Wisler, G. C., F. W. Zettler., and L. Mu. 1987. Virus infections of *Vanilla* and the orchids in French Polynesia. Plant Dis. 71:1125-1129.
50. Wisler, G. C., F. W. Zettler., and D. E. Purcifull. 1982. A sero-diagnostic technique for detecting Cymbidium mosaic and Odontoglossum ringspot viruses . Phytopathology 72:835-837.
51. Wisler, G. C., F. W. Zettler, and T. J. Sheehan. 1980. Relative incidence of Cymbidium mosaic and Odontoglossum ringspot viruses in several genera of wild and cultivated orchids. Proc. Fla. State Hort. Soc. 92:339-340.
52. Zettler, F. W., G. R. Hennen. W. H. Bodnaruk, H. T. Jr. Clifford, and T. J. Sheehan. 1978. Wild and cultivated orchids surveyed in Florida for the Cymbidium mosaic and Odontoglossum ringspot virus. Plant Dis. Repr. 62:949-952.

Characterization and Control of Viruses

Infecting *Phalaenopsis spp*¹

Hwai-Lin Li²

Abstract

Three hundred and twenty-four *Phalaenopsis spp.* samples collected from 7 orchid gardens in Taichung and Taitung district were surveyed for cymbidium mosaic virus (CyMV) and odontoglossum ringspot virus (ORSV) by using DAS-ELISA techniques. The incidence of CyMV and ORSV was 41.24% and 8.9%, respectively. CyMV banded inclusion can be fixed by microwave irradiation with 50% power for 30 sec. Glutaraldehyde can improve the fixation when microwave irradiation applies. CyMV and ORSV were distributed in the roots, leaves and flowers of inoculated *Phalaenopsis* detected by ELISA. In the immunospecific electron microscopy test, CyMV was present in approximately 20% of the apical buds and 30.77% of the lateral buds; ORSV was in every apical buds and 87.5% of the lateral buds. All the 10 *Phalaenopsis* cultivars were susceptible to ORSV, but not to tomato mosaic virus (ToMV) and cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV). TMV only causes partial infection in each cultivar. In the chemical control test, CyMV or ORSV did not spread when cutting tools were treated with 5% NaOH.

Key words : *Phalaenopsis spp.*, ORSV, CyMV, Tool treatment.

¹Part of the M.S.thesis of the author.

²Assistant researcher of Taitung DAIS.