

# 蘭花病毒之診斷、鑑定與偵測

張清安 研究員

行政院農業委員會 農業試驗所

植物病理組

電子郵件：cachang@wufeng.tari.gov.tw；傳真：04-23331089

## 摘要

蘭花為我國現階段最重要之外銷花卉，其中文心蘭、蝴蝶蘭、蕙蘭、及拖鞋蘭為四種栽培面積最多，產業最具規模的蘭種。尤其蝴蝶蘭更是為政府所選定作為外銷重點輔導之旗艦項目。近年來許多國家基於蝴蝶蘭在盆花市場上所表現之強大競爭力，紛紛投入生產行列，造成國際競爭日趨激烈。尤其花卉傳統大國的荷蘭以其深厚之產業發展經驗在短短十年內已經佔據歐洲市場，同時向其他地區急速擴張。為了與我國競爭，荷蘭刻意強調其種苗生產系統有避免病毒感染之設計。相反的，我國蝴蝶蘭產業過去以生產帶花梗之大型開花株為主，這些植株只要開花正常，是否感染病毒對消費者而言並不重要。這樣的產業型態雖然造就了台灣蝴蝶蘭產業的快速擴張，但也使絕大多數業者因而忽略了病毒病的可能影響，疏於防範的結果，造成今日病毒病在蝴蝶蘭業界的普遍蔓延。但近年來我國蝴蝶蘭已逐漸蛻變為生產組織培養瓶苗或中小型種苗為主之種苗供應上游產業型態，因此種苗品質的維護，如何滿足客戶後續栽培之成果，尤其在病毒病的控制上必須保證種苗之健康，已成為未來我國蘭花產業必須接受考驗的課題，未來產業能否持續發展，競爭力能否維持，種苗之健康無病毒將是工作之重點指標。本文將就文獻上已報導之蝴蝶蘭病毒病害加以介紹，另外也將就目前已經證實發生於國內之幾種重要蘭花病毒之特性與診斷、鑑定、及偵測方法，詳加說明，希望幫助產業界增進對感染蘭花之病毒之認識。

**關鍵字：**蘭花、蝴蝶蘭、病毒、診斷、鑑定、偵測

## 緒言

近二十年來我國蘭花產業蓬勃發展，尤其蝴蝶蘭已成為全世界輸出量最高之

國家，農委會更將其選為重點發展之旗艦作物。除蝴蝶蘭外，文心蘭、拖鞋蘭及國蘭等蘭花在外銷上亦展現高度潛力。我國由於氣候高溫多溼，有利於病害之發生，蘭花之栽培一向追求完美之品質，因此產業界對於病害之防治非常重視。各種已知之蘭花病害大都可以用藥劑處理或其他方法達到相當程度之防治效果，唯獨由濾過性病毒(virus)所引起之病害至今尚無有效治療方法，一經感染便對蘭花之生長與品質構成威脅，尤其病毒可以雖無性分生繁殖方式而傳播至後代種苗的特性，更對以蘭花種苗為外銷主力的現今我國蘭花產業構成威脅。

近年來許多國家基於蝴蝶蘭在盆花市場上所表現之強大競爭力，紛紛投入生產行列。許多台灣廠商基於經營成本之考量，外移至大陸或其他國家經營，也是近年來蝴蝶蘭市場競爭日趨激烈之因素之一。這些國家中以荷蘭企圖心最旺盛，挾其在各種花卉產業發展之深厚經驗，快速地在短短十年內佔據歐洲市場，同時向其他地區急速擴張。為了與台灣蝴蝶蘭競爭，荷蘭利用長期在花卉界所建立之品牌與形象，刻意強調其產品注重病毒病之控制，並且以『非無病毒親本絕不用於育種之材料』為訴求不經意的凸顯與台灣蝴蝶蘭種苗之差別。導致近年來我國蝴蝶蘭之外銷在國際競爭上受到空前的壓力。許多國家開始要求我國廠商必須附加病毒檢查證明，不僅增加程序上之繁複，也構成成本上之負擔。在我國原佔有優勢的日本市場中，由於其他國家之競爭加上日本近年來景氣之停頓，蝴蝶蘭逐漸由過去之賣方市場轉而變成現今之買方市場，不僅價格滑落，日方對於產品也經常發生刻意挑剔的狀況，尤其當買方購入栽培後產生疑似病毒病徵時經常與我方發生爭論，責任難以釐清。部分我國廠商為爭取後續商機，經常息事寧人認賠了事，此種狀況在晚近常有耳聞。

我國現今之蝴蝶蘭產業約有二成之種苗乃利用親本授粉所結之種子繁殖而來，稱為「實生苗」，其餘約八成之種苗乃藉由無性組織培養技術，將優良性狀之植株大量複製成為具有完全相同性狀之種苗，這種種苗稱為「分生苗」。不過分生苗雖然可以複製其親本植株之所有優良性狀，但也可能繼承其親本所感染之「病毒病」，而影響後續之栽培、生育與開花品質。這也就是產業界對於病毒病最為忌諱之處。因此優良性狀之蘭株必須經過病毒檢測程序，確定無病毒感染後，才能進行分生組織培養大量複製分生苗，此種程序已成為現今國際蘭花產業界之普識作為。為使親本繁殖前的病毒篩檢工作能夠盡善盡美，必須能夠完整掌握感染蘭花之病毒種類、特性及其診斷鑑定偵測技術等資訊，才能夠建立有效避免病毒感染之蘭花分生苗生產流程。本文將就文獻上已報導之蝴蝶蘭病毒病害加以介紹，另外也將就目前已經證實發生於國內之幾種重要蘭花病毒之特性與診斷、鑑定、及偵測方法，詳加說明。另外也將就過去幾年本研究室執行蘭花病毒檢定業務所遭遇之問題，及業者委託檢定時常有之錯誤認知，詳加討論。希望幫助產業界增進對蘭花病毒及其診斷鑑定偵測技術之認識，並協助其建立無病毒健康種苗之生產系統，未來能進一步提昇我國蝴蝶蘭產業之競爭力。

## 文獻上有紀錄之蘭花病毒種類與特性

病毒病害在蘭花上發生的記載最早是在 1950 年左右，但根據二十世紀初蘭界所發表的一張顯現病毒病徵之嘉德利亞蘭圖片判斷，病毒病可能於 19 世紀以前即已存在。台灣地區栽培蘭花自清朝時期已有記載，病毒病害的發生始於何時已不可考，最早的正式報告是 1973 年證實蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, 簡稱 CymMV)之存在。1980 年發現齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, 簡稱 ORSV)。1985 年確定除 CymMV 及 ORSV 外尚有胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*, 簡稱 CMV)及一種槍彈型病毒(Rhabdoviruses)之發生。不過多項調查報告顯示感染情況最普遍，對經濟層面影響最嚴重的仍非 CymMV 及 ORSV 莫屬。至於國際上文獻有紀錄可以感染蘭科植物之病毒種類至少有 28 種(表一)，但眾多文獻仍指出以 ORSV 及 CymMV 二種病毒對蘭花產業最具影響。

在 28 種有紀錄之蘭花病毒中，其特性被清楚掌握，而且分類地位明確的種類除了 CymMV 及 ORSV 外，尚有 *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* (TomRSV)、*Tomato spotted wild virus* (TSWV)、*Turnip mosaic virus* (TuMV)、*Vanilla mosaic virus* (VaMV)等 14 種(表一)，其餘 12 種病毒大多數只有其顆粒型態被瞭解，對於其他特性如致病病徵、傳播方式及分類地位等並不清楚(表二)，尤其這些病毒通常只是某些地區之特定蘭花標本中所發現之個案而已，其分佈狀況及對蘭花產業之影響層面仍屬未知。

上述 16 種病毒中有五種屬於馬鈴薯 Y 病毒屬(*Potyvirus*)，包括 BYMV、CYVV、TuMV、DenMV、及 VaMV。*Potyvirus* 屬之病毒乃經由汁液傷口接觸及蚜蟲以非永續型方式媒介傳播。根據德國之報導，這些病毒在適當之媒介蚜蟲種類存在下，有時可以非常有效率地在某一特定地區之蘭花上傳播，因此維持無病毒之母本與清潔之栽培環境，以避免蚜蟲之滋生，是控制此類病毒之必要手段。

胡瓜嵌紋病毒(CMV)可能是全世界分佈最廣泛，危害寄主種類最多的球型病毒，其傳播媒介方式與 *Potyvirus* 相同，藉由機械傷口或蚜蟲以非永續型方式傳播。因此所採取之防治措施與前述 *Potyvirus* 屬病毒相同。台灣最早有關 CMV 可以感染蘭花的紀錄是在蝴蝶蘭上所發現的，但根據筆者之調查 CMV 在台灣蘭花上之發生並不普遍，我們雖然曾經在文心蘭上發現 CMV 的感染，但是多數病株並不產生病徵，因此至少目前之情況顯示 CMV 對蘭花經濟生產之影響不大。

已知的蘭花病毒中煙草脆葉病毒(TRV)及蕃茄輪斑病毒(TomRSV)是二種世界上知名之線蟲傳播型病毒，前者之病毒顆粒由幾個不等長度之短桿狀構造組成，後者則為直徑約 30 nm 之球型顆粒，二者在歐洲地區許多花卉作物上發生普

遍，但在蘭花上之發生僅止於少數之個案，對蘭花產業之重要性亦不高。值得注意的是我國至今尚未有此二病毒在任何作物上發生之紀錄。

在有紀錄的 28 種蘭花病毒中至少有 9 種其病毒顆粒是屬於細菌型 (bacilli-form) 或者槍彈型 (bullet-shaped)，依據現行之分類標準這些病毒的分類地位應屬於 Rhabdovirus，但此類病毒之研究難度較高，所以報導雖多，但多半僅有電顯觀察之證據，其他特性資訊均仍缺如。有紀錄的 9 種中只有發生於日本之蘭花斑點病毒 (OFV) 研究較為透測，有關的特性掌握較為明確。OFV 最早是 1969 年由 Doi 等人在日本蕙蘭 (*Cymbidium* spp.) 上所發現而命名。早期學界對 OFV 之瞭解僅止於電子顯微鏡之觀察結果，知道這個病毒不像一般 Rhabdoviruses 具有外套膜。後來日本岡山大學的井上教授發現 OFV 可以經由機械接種，傳染到許多病毒研究常用的草本植物上，這個特性與其他 Rhabdoviruses 也有很大的不同。根據文獻 OFV 可以感染的蘭花種類相當多，台灣常見的蝴蝶蘭、俗稱國蘭類的蕙蘭、石斛蘭、根節蘭、虎頭蘭及托鞋蘭等都有感染之紀錄。近年來岡山大學的研究團隊對 OFV 之探討有重大的突破，其中最值得一提的是發現 OFV 可藉由偽葉滿 (*Brevipalpus californicus*) 以永續型方式傳播。這個紅蜘蛛可以在許多蘭花種類上危害，台灣雖然還沒有正式的發生記錄，但對我們的蘭花產業仍具威脅，未來在檢防疫上需多加留意，甚至將其列為長期監測的對象。

已知的蘭花病毒中石斛蘭葉脈壞疽病毒 (DVMV) 是唯一屬於 *Closterovirus* 的病毒種類。其顆粒為極長之絲狀，長度達 1865 nm。最早於 1977 年由 Lesemann 於德國溫室栽培的秋石斛上所發現。目前 DVMV 只在德國的二個溫室上被發現過，其病徵為葉片及花瓣上出現壞疽條斑。DVMV 在石斛蘭主要產地如泰國新加坡等地區之發生情形則無資料可循。

另外蕙蘭輪斑病毒 (CyRSV) 最早是由 Hollings and Stone 二人在英國 Sussex 地區之虎頭蘭發現。CyRSV 是已知蘭花病毒中唯一屬於 Tombusvirus 屬的病毒，此病毒具有極寬廣的寄主範圍，可經由葉部及根部接觸、土壤甚至灌溉水傳播，且生體外耐熱性高達 85-90°C，性質極為穩定。目前此病毒之分佈以英國為主，雖不普遍，但是基於其可感染國內栽培甚多之虎頭蘭及傳播快速之特性，未來我國應對 CyRSV 之檢疫予以加強，尤其蘭花產業人士在進行種原交換或引進時應特別注意，以避免將其引進國內。此病毒若不幸入侵台灣，挾其超級穩定極易污染栽培環境之特性，對於我國溫室栽培之蘭花種類將產生一定程度之威脅。

上述 16 種病毒中有兩種是屬於 *Tospovirus* 屬的病毒，包括鳳仙花壞疽斑點病毒 (INSV) 及蕃茄斑點萎凋病毒 (TSWV)。此屬病毒之特點為經由薊馬 (thrips) 以永續型方式 (persistent manner) 傳播。病毒顆粒為球型，直徑 85 nm，具有套膜 (enveloped)。早期此類病毒之鑑定極為困難，因為病毒極不穩定，接種不容易，抗血清之製作又受限於病毒顆粒之純化不易，因此血清之品質普遍不佳，導致病毒分類與鑑定之結果混亂。近年來由於分子生物技術之進步，可以應用核酸序列進行比對。加上 Tospoviruses 核鞘蛋白 (nuclear capsid protein) 純化技術之突破，並證明其抗血清可以將此屬病毒做出明確的分類，因此近年來對於此屬病毒種類

之鑑定結果才較為可靠，早年的資料可能都需重新加以評估才能確定。

## 發生於我國之蘭花病毒種類、特性與診斷鑑定要領

### 一、齒舌蘭輪斑病毒(ORSV)

國內所栽培之蝴蝶蘭、文心蘭、嘉德利亞蘭、報歲蘭、四季蘭及素心蘭等蘭種經常可以發現 ORSV 感染之情形，尤其在蝴蝶蘭上發生最為普遍。但不同蘭屬或品種感染 ORSV 後所產生之病徵會有所差異。ORSV 可能造成之病徵包括輪斑(ringspot)，另外嵌紋(mosaic)、斑紋(mottle)、黃化條紋(chlorotic streak)、花色條斑(color breaking)甚至壞疽(necrosis)等，這些病徵中以嵌紋與斑紋最為常見。另外有部份蘭花品種感染 ORSV 後並不表現病徵，此現象尤其在幼年期之蝴蝶蘭及文心蘭特別常見，這些植株通常要等到第一次開花後才會逐漸顯現病徵。另外 ORSV 若與 CymMV 複合感染同一蘭株，其病徵通常會較單獨感染者明顯。

ORSV 屬煙草嵌紋病毒屬(Tobamovirus)。過去部份文獻認為 ORSV 應為煙草嵌紋病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)之蘭花系統(TMV-O)，但也有相當多之學者證實 ORSV 為獨立之 Tobamovirus 而非屬於 TMV 之一系統 (Edwardson and Zettler, 1988)。最近日本學者 Isomura 等更提出核酸序列分析之證據，支持 ORSV 乃異於 TMV 之獨立病毒。

ORSV 之分佈應已遍及全世界各地商業生產之蘭園。至少有 30 種蘭屬被證實可以被 ORSV 感染。經由人工接種方式 ORSV 可以感染 *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Zinnia elegans*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Samsun, *N. tabacum* cv. Xanthi-nc, *N. clevelandii*, *Cassia occidentalis*, *Tetragonia expansa*, *Gomphrena globosa* 及 *Beta vulgaris* 等。

ORSV 主要藉機械性傷口傳染，至今未發現有任何昆蟲或生物可以媒介此病毒。ORSV 性質穩定，於細胞外可以存活至少 10 年以上。因此可以污染工具、盆鉢、植材、甚至灌溉水。另外組織培養技術作業場所如無菌操作台、工具、花梗處理器具等都有可能污染 ORSV 病毒顆粒，若不加以處理，將成為後續感染組織培養幼苗之來源。

雖然多數文獻均認同 ORSV 不會經由種子帶毒而傳播，但根據我們的研究，感染 ORSV 之蘭花若作為母本進行雜交授粉，所結之果莢其組織與內部絨毛均可潛藏極高濃度之病毒顆粒，特別是近年來所慣用的未成熟果莢播種技術，常會將絨毛連同種子一起放入組培瓶中培養，如此將使絨毛中所夾帶的病毒有機會在後續的繼代培養操作時藉由傷口入侵部分發芽之實生苗，形成感染源後再逐漸傳播到其他種苗個體，甚至污染操作工具與台面，造成後續傳染。

ORSV 之病毒形態為典型 tobamoviruses 之直硬桿狀顆粒。活體外 (in vitro) 耐熱度 90-95°C；耐稀釋性達  $10^{-7}$  以上；耐保存性最長之記錄超過 10 年以上

(Inouye, 1983)。

## ORSV 之診斷要領

根據感病植物所表現之病徵進行診斷是一般蘭花栽培者最慣用之方法，但其正確性常因蘭花品種對病毒感受性之差異或處於潛伏期而受影響，故正確之診斷應配合其他較敏感方法為佳。可應用於 ORSV 診斷之方法包括

### 一、指示植物生物檢定法

利用一些比蘭花本身對 ORSV 更敏感的指示植物進行接種，再根據所產生之特殊病徵判斷。最常用之 ORSV 指示植物有 *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, 及 *N. benthamiana* 等。不過影響人工接種結果的因素很多，操作者必須具備豐富經驗，否則導致誤診之機會很大，而且由於時效之限制，無法處理大量樣品也是應用此一診斷方式之限制。

### 二、電子顯微鏡觀察法

應用電子顯微鏡檢查病株是否有 ORSV 之典型短桿狀顆粒，亦為常用可行之方法，若再配合應用 ORSV 抗體進行所謂的免疫電顯觀察(immuno-specific electron microscopy, ISEM)，可進一步提升電顯觀察之敏感度。

### 三、光學顯微鏡鏡檢法

1980 年代由 Univ. of Florida, R. Christie 等人所發展之光學顯微鏡鏡檢法，可依據 ORSV 於寄主細胞質內所形成之特殊圓盤形或紡錘形結晶狀內含體(crystalline inclusion)作為判別之依據。

### 四、抗血清檢定法

事實上近年來應用在 ORSV 之診斷上最普遍之方法是抗血清檢定法，特別是酵素聯結免疫吸附法(ELISA)及免疫點漬法(immunoblotting test)最為產業界所接受。尤其 ELISA 的檢測結果可以透過吸光度讀值儀的判讀，將其轉換成數值成為客觀判定感染與否之證據，這些證據可以作為產業甚至國際間檢疫驗證之依據，減少因個人主觀認定所可能造成之爭議。自從 1980 年 ELISA 被開發為病毒檢查技術至今已逾二十年，國際文獻已充分認定其敏感度與結果之重現性，這段期間許多先進國家已將其發展成為例行性及高輸出植物樣品之檢定流程，甚至許多幾近於自動化的操作機械均已被開發並廣泛應用。因此 ELISA 之檢定成本已經被壓低到產業界能夠接受之程度，許多國際種苗大公司均已將其列為日常例行應用之病毒檢定技術。

### 五、核酸檢定法

90 年代以來逐漸廣為應用之核酸檢定法，如核酸探針雜配法(DNA probe hybridization)及反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)，亦已被發展成為例行之 ORSV 檢定法。本實驗室更已發展出可以於單步驟同時檢定 ORSV 及 CymMV 的 multiplex RT-PCR 流程。並且於最近進一步結合生物晶片雜配法，利用固定在晶片上的病毒專一性探針，可針對 RT-PCR 反應之產物進行捕捉，再以明確而單純之化學顏色變化圖譜，真實反應預期 PCR 產物是否存在之事實。此種生物晶

片檢測流程可改進 PCR 在應用電泳膠檢 PCR 產物時常發生不易判讀之缺點，提升其結果重現性與作業效率。晚近本實驗室在多次例行 ELISA 調查時發現許多蘭花樣品呈現 ELISA 負反應，但是進行 RT-PCR 時卻出現正反應之結果，經以生物檢定法進行確定後證實的確為感染 ORSV 之植株。顯示部分蘭花植株尤其是組織培養中之幼苗單獨感染 ORSV 時病毒基因會呈現極低之表現，導致感病組織內僅累積極少之病毒顆粒，因而超出 ELISA 檢測之範圍。此種現象在其他病毒案例上亦曾被發現。因此，未來進行蘭花 ORSV 檢定時應考慮配合 RT-PCR 甚至生物晶片檢測法，尤其對於重要親本品系進行分生組織繁殖前，為確保未來所複製之後代分生苗免於病毒感染，應在 ELISA 例行篩選後，再以 RT-PCR 或生物晶片加以確定，其結果較有保障。

當然 RT-PCR 或生物晶片之流程較為繁複，技術門檻高於傳統抗血清檢定，且成本較高，近期內要全面取代較為便捷與經濟之抗血清法仍不可能。

## 二、蕙蘭嵌紋病毒(CymMV)

不同於 ORSV，CymMV 所感染之蘭株經常有產生壞疽型病徵之傾向，如黑色壞疽斑點(spots)、壞疽條紋(line patterns)等，產生之部位除葉部、莖部外，花部壞疽也是 CymMV 特有之病徵。最常見之例子是報歲蘭、嘉德利亞蘭、文心蘭、虎頭蘭、萬代蘭及蝴蝶蘭。壞疽班有時只出現於葉片下表面，而不發生於上表面，此種現象在文心、石斛、萬代及蝴蝶蘭均有發現，因此常被栽培者誤認為真菌感染所致。部份感染 CymMV 之蘭屬如虎頭蘭、報歲蘭、文心蘭及蝴蝶蘭也會產生黃綠斑駁之嵌紋(mosaic)病徵，但是與 ORSV 不同的是 CymMV 所產生的褪綠黃化斑經常是長條狀，且也就是文獻上常稱的條斑(streak or stripe)病徵，而 ORSV 所產生的較常是不規則形狀之斑塊(patches)。人工栽培之蘭園中 CymMV 與 ORSV 複合感染同一蘭株之現象極為普遍，對蘭株之影響有加成效果(synergistic effect)，病徵會遠比單獨感染時嚴重許多。另外也有部份蘭花種類感染 CymMV 後並不表現任何可辨識病徵。但是單獨感染 CymMV 而不出現病徵之比率較單獨感染 ORSV 者為低，換言之，單獨感染 CymMV 之蘭株比較容易展現病徵。

CymMV 乃馬鈴薯 X 病毒屬(Potexvirus)之一員，被認為是全球各地人工栽培蘭株上發生最普遍之病毒。利用人工接種之方式 CymMV 也可以感染 *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium*, 及 *Cassia occidentalis* 形成局部病斑，因此這些寄主可以作為指示植物進行 CymMV 之生物檢定。

CymMV 之傳播方式與 ORSV 完全相同，其性質亦極為穩定，在細胞外可以存活多日，故 CymMV 也可以污染蘭花栽培場中所有可能接觸到感病植株汁液的器具或操作人員之手，然後再藉傷口進入新寄主蘭株感染。另外，CymMV 也可以經由實生苗傳播，其機制與 ORSV 相同。

CymMV 之病毒形態為絲狀易彎曲顆粒，長度 415-475nm，寬度 13-18nm。活體外 (in vitro) 耐熱度 65-70 C；於室溫下病毒可維持活性至少 7 天以上。

## CymMV 之診斷要領

利用觀察病徵方式進行 CymMV 之診斷，在少數被感染後可以穩定出現典型病徵之蘭花種類上是可行的，但對於大多數蘭種而言，被 CymMV 感染後所表現之病徵並不穩定，因此，只依據病徵診斷並不可靠。應用於 CymMV 診斷之方法包括：

### 1. 指示植物生物檢定法

此乃針對病毒生物特性所發展之方法，可利用之指示植物包括 *Cassia occidentalis*、*C. amaranticolor*、*C. quinoa*、*Tetragonia expensa* 及 *Datura stramonium* 等。然而影響接種成功與否的因素很多，除非操作者經驗豐富，否則誤診之機會仍然很大。而且若以此作為例行之檢定方法則必需有設備良好，空間足夠的溫室與優質維護管理之人工。這樣的要求對於一般中小型蘭花業者而言較為困難，因此指示植物生物檢定法通常應用於專業之病毒研究室，作為輔助其他診斷鑑定技術之用。

### 2. 電子顯微鏡觀察法：

此乃以電子顯微鏡觀察蘭株組織有否 CymMV 之典型絲狀病毒顆粒作為判別之依據。另外配合 CymMV 專一性抗體之應用(如 ISEM)能進一步提升電顯觀察之敏感度。不過由於電子顯微鏡並不普遍，這個方法也是專業病毒研究室才有可能常加應用。

### 3. 光學顯微鏡觀察法：

此乃根據 Christie and Edwardson (1977) 所發展之技術，利用染色法於一般光學顯微鏡下觀察 CymMV 於寄主細胞內所形成之內含體 (inclusion body)。根據報告 CymMV 可於寄主細胞質中產生帶狀内含體 (banded body)，可作為判別之依據。不過此法必須仰賴有經驗之專家，才能做出較正確的判別。而且也僅是用於少量樣品之檢測，對於產業界高輸出樣品作業環境下的病毒檢定並不適用。

### 4. 抗血清檢定法：

此乃目前各種檢查法中應用最普遍的一種。常用之血清檢定法包括免疫擴散法(SDS-immunodiffusion test)、酵聯抗體法(ELISA)及免疫點漬法(immunoblotting test) 等三種，其中以 ELISA 在國際上應用最普遍，且被公認為最客觀，結果重現性較高之檢定法。不過抗血清檢定法之關鍵在於能否穩定取得優質之專一性抗體，此點在國內早已被本實驗室克服，並應用推廣多年。另外晚近有生技公司發展出改良型的免疫點漬法，號稱植物病毒快速檢定試劑套組，可以同時檢定 ORSV 及 CymMV 二種病毒，所有流程可以在半小時內完成，結果不需藉由儀器判別，可由使用人自行肉眼判斷，適合少量樣品現場立即診斷。

## 5. 核酸檢查法：

此法乃以病毒核酸為檢測之對象，常用的方法包括核酸探針雜配法及晚近生物技術上所廣泛應用之 RT-PCR 反應，此二方法均已在本實驗室發展成熟並實際應用當中。本實驗室更已發展出可以於單步驟同時檢定 ORSV 及 CymMV 的 multiplex RT-PCR 流程。並且於最近進一步結合生物晶片雜配法，開發成商用生物晶片檢測試劑套組。此套組透過簡單肉眼即可判讀之顏色變化圖譜，可以於七小時內獲得正確之病毒反應訊號，提升 RT-PCR 檢定效率與結果判讀之客觀性與重現性。臨床測試結果證實此一生物晶片檢測流程對 CymMV 及 ORSV 之檢出率均可達到 97%。

## 三、胡瓜嵌紋病毒 (CMV)

CMV 感染蘭花之例子並不多，本省僅在蝴蝶蘭上曾經有報告。主要病徵為葉部產生黃化條紋或全葉黃化，另外對於紅色系品種之花瓣上會產生退色條斑。CMV 在蘭花上之發生生態與 CymMV 及 ORSV 絕然不同。CMV 主要應該來自於蘭園周圍之其他感病作物再經由蚜蟲以非永續方式(non-persistent)媒介傳入蘭花。可傳播 CMV 之蚜蟲種類超過 60 種以上，加上 CMV 之寄主範圍廣泛，因此在本省秋冬之蚜蟲族群高峰季節 CMV 之傳播極為普遍。若蘭花栽培在開放空間下則被 CMV 感染之機會並非沒有，所幸本省目前蝴蝶蘭均栽培於密閉式溫室或網室，除非分生組織培養過程中母本為帶毒者，否則 CMV 大舉發生之機會不高。本實驗室在例行的調查中發現，文心蘭確有被 CMV 感染之情形，此與文心蘭多半栽培在簡易遮陰網室環境下，有利於帶毒蚜蟲入侵有關，但單獨感染 CMV 之文心蘭多半沒有出現任何病徵。另外極少數之蝴蝶蘭樣品也有被偵測到感染 CMV 之 ELISA 訊號，但這些植株也都未出現任何病徵。因此我們研判 CMV 雖然可能感染部分蘭花種類，但造成嚴重病徵影響蘭株生育及開花品質之機會不高。

CMV 為 Cucumovirus 之成員。病毒顆粒為球形多面體，直徑約 28nm，基因體由四段大小不等之 RNA 組成，其中 RNA4 為 RNA3 之次基因體核酸 (subgenomic RNA)，僅帶有鞘蛋白訊息。此屬病毒只含有三個種(Cucumber mosaic virus, Tomato aspermy virus 及 Peanut stunt virus)，屬內的三個病毒種彼此間具血緣關係。CMV 可感染為數極多之經濟作物種類，分布遍及全球。

## CMV 之診斷要領

根據文獻 CMV 感染蝴蝶蘭所造成之黃化條斑型病徵與 CymMV 者頗為類似，因此僅根據病徵作為 CMV 之診斷依據並不可靠。理想之 CMV 診斷方法包括 ELISA，SDS-immunodiffusion test 及免疫點漬法均可適用，當然最關鍵的是需要有優質的抗血清才能獲得正確可靠的結果。另外近年來所發展之 RT-PCR 及核酸探針雜配法亦可輔助抗血清檢定法，以獲得正確之診斷。

#### 四、辣椒黃化病毒 *Capsicum chlorosis virus* (CaCV)

過去十年來一些蝴蝶蘭品種常在冬季低溫期於完全展開之新葉上出現黃化輪斑，輪斑呈現同心圓狀向外圍擴張，有時會遍及整個葉片。輪斑上的黃化線條會有凹陷情形，甚至出現壞疽現象。但此類蘭株當氣溫回升，新生的葉片卻又恢復正常，輪斑不再出現。此種病徵一直被懷疑與病毒有關，但國際學研界卻也一直無法證明到底是何種病毒所感染。但由於十年來我國對外輸出蝴蝶蘭種苗數量佔世界首位，各國均一再指控我國為此病害的原生地，對我國輸出之種苗信譽產生負面影響。

2003年台中區農業改良場陳慶忠博士在中部地區所栽培之蝴蝶蘭分離獲得一個可以造成蝴蝶蘭葉片呈現凹陷壞疽輪斑(necrotic ringspot)病徵之分離株，並且與中興大學詹富智老師合作下證實為一 tospovirus 分離株。但後來的試驗結果發現蝴蝶蘭上的 tospovirus 分離株與1999年筆者在發生壞疽輪斑病徵的大岩桐上所分離之 tospovirus (*gloxinia ringspot virus*)及徐惠迪博士在美國大岩桐上所分離的 tospovirus (HT-1)在分子特性上極為類似，三者間在核鞘蛋白(nucleocapsid protein, NP)之核苷酸及氨基酸序列相同度(identity)均高達92%以上，故基於國際病毒分類原則，台灣蝴蝶蘭上所分離之 tospovirus 應與上述二個由大岩桐上所分離之 tospoviruses 屬於相同病毒之不同系統(strain)。近年來澳洲及泰國等地之蕃茄與落花生上均陸續發現與此病毒之 NP 序列相同度超過90%之病毒分離株，且均冠以不同名稱，造成分類上之混亂，基於這些報告中以澳洲所發表的 *Capsicum chlorosis virus* (CaCV)(AY036057)年代(2001)最早，因此我們建議將此類相關病毒統稱 CaCV，而蝴蝶蘭上所發現之 tospovirus 自然應該稱為 CaCV 之蝴蝶蘭系統 (*Phalaenopsis strain*)。據了解目前 CaCV 在台灣蝴蝶蘭上之分佈並不普遍，根據業者之觀察 CaCV 之發生與特定蝴蝶蘭品種之雜交後代有密切關係，另外也發現 CaCV 之壞疽輪斑病徵之表現與低溫季節有關。過去幾年曾經有部分大白花品系蝴蝶蘭嚴重發生此病害，但近年來由於業者淘汰敏感品系的作為產生效果，CaCV 的發生似乎已經趨緩。但筆者提醒國內業者，雖然 CaCV 的發生好像與蝴蝶蘭品種有關，但業者仍必須注意此類病毒具有高度變異之特性，我們不排除其將來會有可以感染多數蝴蝶蘭品系的變異株出現，因此建議業者需多加注意防治可能媒介此病毒之薊馬(thrips)，以降低此病毒之擴散機率。

目前的研究結果顯示感染蝴蝶蘭的 CaCV 分離株與美國、台灣、澳洲、及泰國在大岩桐、蕃茄、甜椒及落花生上所獲得之分離株在 NP 蛋白之核苷酸及氨基酸序列上均有超過90%以上的相同度。因此按照國際病毒分類命名之慣例，這些病毒應以最先發表之名稱為準，我們建議將其命名為 CaCV 蝴蝶蘭分離株。探討 CaCV 核鞘蛋白(NP)之血清特性，發現它屬於 Tospovirus 屬之第四血清型，與發生在瓜類作物上的西瓜銀斑病毒(Watermelon silver mottle virus, WSMoV)具有頗為接近的血清類緣關係。

筆者認為呈現壞疽輪斑病徵之蝴蝶蘭在我國蝴蝶蘭園存在至少超過十年

以上，由於十年來我國一直是全球輸出蝴蝶蘭種苗數量最多之國家，因此許多國家一直認為我國是蝴蝶蘭壞疽輪斑病的主要發源地。目前這個病毒應該已經蔓延到多數栽培蝴蝶蘭的國家或地區。事實上早在 1997 年筆者在訪問 Florida 大學時就已經在當地溫室看到蝴蝶蘭上有類似的病徵。因此此病害到底源自何處已很難考證。

CaCV 天然寄主除蝴蝶蘭外應該至少包括大岩桐。在人為刻意機械接種下，CaCV 還可以感染甜椒造成黃化輪斑病徵，感染蕃杏(*Tetragonia expansa*)造成局部斑點。

根據文獻所有的 Tospovirus 屬病毒均可藉由薊馬(thrips)以永續型方式傳播。晚近泰國的一篇報告證實泰國感染蕃茄的 CaCV 系統可以經由一種 *Ceratothripoides claratris* 薊馬傳播，此屬薊馬並位於台灣發生，因此台灣的 CaCV 蝴蝶蘭系統可能上还有其他種類之傳播薊馬，有待釐清。

CaCV 病毒為典型的 tospovirus 大型球形顆粒，表面有附膜(enveloped)，直徑約 85 nm。一般而言所有 tospoviruses 性質均極不穩定，在生體外(in vitro)存活時間很短。接種時必須於研磨接種源病葉時在緩衝液中添加抗氧化劑如  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ，而且必須在低溫下迅速為之，成功接種之機會較高。此病毒耐熱性極差，高於 45°C 即失去活性。

### CaCV 之診斷要領

診斷蝴蝶蘭 CaCV 可以依據其異於其他蘭花病毒之特殊黃化輪斑型病徵為之。不過其病徵之出現似乎與低溫有密切關係，其他季節中病株並不易出現病徵。但近年來我國各地蝴蝶蘭園常發現有類似但有差異的黃斑型病徵，這種黃斑型病徵不會呈現同心輪斑，也不會繼續擴大，更不會出現壞疽。黃斑之大小與型態均不一致，同一葉片上可能出現多數黃斑，也可能聚集或靠近在軸心部位。這種黃斑型病徵是否為病毒感染所致仍未確定，但可以確定的是不會與 CaCV 之 NP 抗血清於 ELISA 下反應，故應該不是 CaCV 感染所造成。至於典型壞疽輪斑病徵之植株可以與 CaCV 之 NP 抗血清於 ELISA 下發生強烈反應，但值得注意的是筆者發現抗血清只能與呈現黃化或壞疽之輪斑部位產生反應，離開有病徵的部位則完全不反應，同一植株中未出現病徵之葉片也不與血清反應。此現象極為特殊，反映出一般 tospoviruses 於寄主中病毒濃度不高的特性，可作為診斷之參考。

另外此病毒也可以利用 Chu et al., (2001)所發表之 tospoviruses 屬間廣效性簡併式引子對進行 RT-PCR 檢定，預期產物約 890 bp，但筆者的試驗結果亦發現只能在呈現黃化輪斑病徵的部位獲得正反應，若採取非輪斑部位組織為檢測樣品，其結果通常為負反應。晚近筆者實驗室已發展出一種可以於單步驟下同時檢測蘭花 CaCV、ORSV 及 CymMV 之 multiplex RT-PCR 檢測技術。

### 五、蘭花斑點病毒(Orchid fleck virus, OFV)

OFV 於 1969 年首次於日本被發現，隨後陸續在德國、澳洲及巴西也有相關之報導。OFV 為 *Rhabdovirus* 屬病毒，具槍彈型顆粒，可經由偽葉蟬(*Brevipalpus californicus*)傳播。此偽葉蟬在台灣雖有過發生之記錄，但並未被證實會在蘭園中發生。過去台灣從未有 OFV 發生的紀錄，也尚未建立檢測的方法。

本研究室於鹿谷鄉民自家庭園所栽培之虎頭蘭發現部分植株葉片呈現與葉脈平行，且斷續出現之短條狀黃色斑點病徵。此等植株攜回實驗室並接種於奎藜後，發現可以引起黃化局部斑點。但該植株樣品及所接種之奎藜葉片均不與已知感染蘭花之病毒抗血清反應。爾後發現應用澳洲學者 Blanchfield et al. (2001)所發表之 OFV 專一性引子對 polydT/SP6 及 mN2 進行 RT-PCR，可以得到約 800 bp 之增幅產物，經選殖於 pCRII TOPO TA 載體並加以定序後獲得一 783 bp 之核酸序列。與 GenBank 已知病毒序列比對後證實為 OFV 之核蛋白(nucleoprotein)基因之 3'端序列，對應核蛋白 C 端之 240 個胺基酸，與已登錄之 OFV 序列比對相似度達 83.4-98.8%，證明確實為 OFV 之一個分離株，此乃 OFV 於台灣發生之首次紀錄。隨後設計含有限制酵素切位 NcoI 及 XhoI 之專一性引子對 OFVncp-up1 及 OFVncp-dw1，將 OFV 核蛋白基因之部分序列加以增幅，以 NcoI 及 XhoI 限制酵素剪切再選殖於表達載體 pET28b(+)(Novagen)進而轉型於寄主細菌 *E. coli* Rosetta (DE3)，經由 IPTG 誘導促使寄主細菌大量表達 OFV 部分核蛋白序列，經電泳分析確定所表現之部分核蛋白分子量約為 27 kDa。此蛋白於西方轉漬反應中與日本學者 Dr. Kondo 所提供之 OFV 抗血清(OFV-so)呈現強烈反應，證實確為 OFV 核蛋白基因所表達之產物。將此細菌表現蛋白大量純化後進行兔免疫注射，獲得對應之抗血清 (#124)。測試此抗體的反應性後確定其可應用於直接式酵素連結免疫吸附法(direct ELISA)、西方轉漬反應(Western blot)及免疫擴散反應(SDS-immunodiffusion test)中，與鹿谷虎頭蘭病株之粗汁液及細菌表現蛋白產生強烈反應，但不與健康對照蘭花抗原反應，顯示此抗體確實可應用於 OFV 之專一性檢測。應用此抗血清所進行之初步監測試驗顯示國內經濟栽培之蘭園中尚未發現 OFV 感染之個案。

## 對蘭花病毒檢定應有的認識

蘭花分生苗繁殖前應就原始親本進行病毒篩檢，確定無病毒感染後才進入組培程序。組培繁殖中各階段之培植體最好也能夠進行檢測監控，確定為遭受病毒污染時才能繼續增殖。執行病毒檢測時必須考量下列多項因素，這些因素都可能影響結果之判斷。

### 1. 檢定技術的影響

不同的檢定技術有不同的敏感性(sensitivity)、重現性(reproducibility)及正確

性(Accuracy)。一般而言，隨著科技的進步，愈新研發的技術在敏感度、重現性與正確性上都會持續有所改善，可是相對的此等技術通常需要較昂貴的使用成本，而在檢定效率上可能較為繁複，或較為耗時，無法同時處理為數較多的樣品。因此選擇適合自己需求的檢定技術非常重要，業者可以先釐清每一種技術的敏感度、重現性與正確性，再考量自己的成本與時間的壓力，以選擇適合不同狀況使用的技術加以應用。這裡要強調的是，沒有一種檢定技術是完美無缺的。我們只能根據不同的環境，選擇最適當的方法來應用而已。

理論上，任何一種技術都有其「極限(limitation)」，或「量測不確定度(measurement uncertainty)」，也就是說任何一種技術所檢測出來的結果都會呈現一個合理範圍的偏差數值。理想中這個偏差數值當然愈小愈好，可是重點是「不會完全沒有偏差」。因此，目前所採用的病毒檢定技術不管那一種都難以獲得百分之百的檢出率而達到百分之百的正確性。換言之，理論上任何一種檢定技術都可能發生漏檢的情形，這雖是無法避免的痛苦，但也是必須認同的現實。基於此先天上的限制，我們能夠做的就是盡量提升每一種技術的結果重現性(result reproducibility)與執行此技術的穩定性(stability)。而且在選擇檢定技術時，考量各種技術的本質，選擇最適當的技術，避免發生漏檢時所可能引發的風險(risk)。

在健康種苗生產的各種環節中，若發生病毒漏檢現象，所引發之經濟損失各有不同。也就是說，各繁殖階段的「漏檢風險值(economic risk of detection escape)」會有不同。舉例而言，在漏檢風險值高的母本繁殖階段，應該選擇敏感性與正確性(accuracy)高的檢定技術。此階段因為樣品數量少，因此不必完全考量成本因素，而必須以提升檢出率為依歸。然而當種苗已經繁殖到商業成品階段，由於種苗數量已經累積成千上萬，此時若需進行病毒檢定，必須選擇效率高之檢測技術，方能面對為數眾多的樣品，以目前世界先進各國包括荷蘭在內在此階段最廣泛應用之病毒檢定技術乃酵素連結抗體免疫檢測法(ELISA)。此技術之檢測敏感度雖然未盡完美，但多年來之經驗顯示已符合現實之需求，雖然漏檢之風險難免，然而此階段縱使發生漏檢所可能引發之風險值通常僅止於單一種苗的價值，仍屬企業可接受之範圍。

## 2. 採樣方法的影響

過去的觀念常以為病毒感染植物後一定會形成系統性分佈，所以只要採取植物的任一部位都能順利將病毒檢測出來，其實這是太過樂觀的作法。近年來已經有許多科學性的證據證明有些病毒感染後在病株上的分佈並不均勻，有些傾向在葉部累積較高的濃度，有些則傾向累積於根部或其他組織中。我們甚至發現部分病毒就算在同一葉片上其分佈也不均勻，葉片尖端與葉基組織之病毒濃度可能有極大的差異。因此不同的採樣方法會對檢測的結果產生關鍵性的差異。我們建議針對不同病毒應該就其在標的作物上不同部位組織之分佈情形加以探討；另外也應該研擬最佳的採樣方式，也就是說要擬定一種漏檢機率最低的採樣方式，作為檢測不同病毒在特定作物上的標準作業流程。這些年來我們在執行多項病毒檢

定上所累積的經驗顯示，不管任何病毒病例，應把握不同部位多重採樣再混和檢定之原則。且採樣點愈多，未來所獲得之檢定結果，漏檢之機率愈小，反之，若僅採取葉片上某一個部位送檢，則未來檢定結果將會有一定的漏檢風險存在。

### 3. 樣品儲存與寄送方式之影響

待檢之組織當被工作人員從植株上採樣後到進行檢定試驗前，應加以適當儲存，否則會影響未來檢測結果之正確性。不同病毒種類之組織或不同寄主植物的組織所適應之最佳儲存方式不同，應加以釐清，才能作最適當的處置，以獲取最正確的病毒檢定結果。以蘭花病毒 ORSV 與 CymMV 為例，當葉片或根部取得後，應置於封口塑膠袋中，若需寄送至他處，則必須以可以避免郵遞過程被擠壓的方式，例如以硬紙箱寄送最為理想。樣品採樣後最好儘速寄送不要儲藏。若需儲藏最好至於常溫下，不要置入冰箱保存，否則寄送過程中恢復常溫，容易腐爛而影響檢定結果之正確。檢定單位於接獲樣品後若無法立即進行檢定試驗，應置於 4 C 冰箱內儲存，切勿儲存於上層冷凍庫中，否則容易腐爛。

### 4. 檢定季節與時機的影響

不同病毒種類對適合繁殖的環境有不同的需求，在適宜的環境下病毒顆粒繁殖迅速，因此在寄主組織內累積的濃度較高，也較容易被檢測出來。反之，不適當的繁殖環境下，病毒濃度極低，分佈更不均勻，逃過檢定之機會較高。此外，病毒也可能以核酸的形式存在寄主組織中，這種狀況下，若以抗血清檢定法進行偵測，可能無法獲得正確的感染判斷。近年來國際上累積的科學證據已經確認此種現象；因此每一種病毒病例應澄清是否病毒會以核酸形式累積，再選擇適當的技術進行偵測，才能獲得正確結果。另外，病毒感染寄主後，會有一段的潛伏期，此其間病毒會慢慢繁殖，且逐漸分佈到全身組織中。因此這段期間內病毒濃度極低，不容易被偵測出來。有些病毒感染後在寄主組織內所累積的濃度常呈現忽高忽低的變化，而不是一般想像中維持一定濃度的水平，因此最保險的檢定方式，應該至少進行二次檢定，每次間隔一到二個月，若二次均未被檢測到病毒感染才能加以確定。

### 5. 檢定流程中所可能引發之變數

此部分對於執行病毒檢定的實驗室而言，極為重要。下列幾項因素可能造成檢定流程的穩定性(stability)發生變化，進而引發結果重現性(result reproducibility)與正確性(accuracy)之降低。這些因素包括：

- 對照病毒抗原(reference viral antigens)
- 對照無病毒抗原(reference healthy control antigens)
- 樣品之處置(sample preparation)
- 檢定環境的穩定(stability of laboratory environment)
- 重複的應用(replication of experiment)

藥品與溶液之穩定性(stability of chemicals and solutions)

儀器設備之穩定性(stability of equipment)

操作人員之穩定性(stability of technicians)

結果之紀錄與保存(data recording and preservation)

一個優良的檢定實驗室應該針對上述可能引發檢定結果偏差的因素，設計有系統的管理模式，將所有可能的變因加以控制，才能提升檢定結果的重現性。

## 結 語

掌握蘭花病毒之正確診斷、鑑定與偵測技術為做好蘭花健康無病毒種苗生產之關鍵，本文敘述文獻上所記載之各種蘭花病毒之種類、特性與各種診斷鑑定及偵測技術。尤其強調現階段國內蘭花上所已知發生之病毒，另外也就本實驗室過去多年執行蘭花病毒檢定服務之經驗，說明業者常有之錯誤認知。希望能提供各界對於蘭花病毒檢定之正確觀念，促使未來在生產健康無病毒蘭花種苗時能夠更加精準有效，使我國蘭花種苗之品質能夠進一步提昇，強化國際競爭力。

## 引用文獻

- 林如玲、張清安、陳金枝 1999. 蕃茄斑萎病毒大岩桐分離株核鞘蛋白基因之選殖及核甘酸序列分析。植物病理學會刊 8:182.
- 張清安 2001. 病毒病害。p.57-74. 植物保護圖鑑系列-洋蘭保護。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出版。127 pp。
- 張清安、陳金枝、王昭萍 1999. 一種專供文心蘭組織培養瓶苗檢定用之高效率反轉路聚合酶連鎖反應之研發。植物病理學會刊 8:180.
- 張清安、曾雅詩、陳金枝、鄧汀欽 1999. 應用聚合酶連鎖反應及核酸探針雜配法偵測齒舌蘭輪斑病毒。植物病理學會刊 8: 29-36.
- Ajjikutira, P. A., Lim-Ho, C. L., Woon, M. H., Ryu, K. H., Chang, C. A., Loh, C. S., and Wong, S. M. 2002. Genetic variability in the coat protein genes of two orchid viruses: *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. Archives of Virology 147:1943-1954.
- Blanchfield, A. L., Mackenzie, A. M., Gibbs, A., Kondo, H., Tamada, T. and Wilson, C. R. 2001 Identification of *Orchid fleck virus* by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and analysis of isolate relationships. J. Phytopathology 149: 713-718.

- Chang, C. A., and Pang, J. H. 1990. Preparation of antisera against *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* and their uses in serological indexing for orchid industry in Taiwan. Plant Prot. Bul. 32:336.
- Chang, M. U., Arai, K., Doi, Y., and Yora, K. 1976. Morphology and intracellular appearance of *Orchid fleck virus*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42:156-167.
- Chu, F. -H., Chao, C. -H., Chung, M. -H., Chen, C. -C., and Yeh, S. -D. 2001. Completion of the genome sequence of *Watermelon silver mottle virus* and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. Phytopathology 91:361-368
- Doi, Y., Chang, M. U., and Yora, K. 1977. *Orchid fleck virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses. No. 183, 3pp.
- Edwardson J. R., and Zettler, F. W. 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.
- Francki, R. I. B., Mossop, D. W., Hatta, T. 1979. *Cucumber mosaic virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No. 213.
- Hollings, M., and Stone, O. M. 1977. *Cymbidium ringspot virus*. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 178.
- Hsu, H. T., Vongsasitorn, D., and Lawson R. H. 1992. An improved method for serological detection of *Cymbidium mosaic potyvirus* infection in orchids. Phytopathology 82:491-495.
- Hu, J. S., Ferreira, D., Wang, M., and Xu, M. Q. 1993. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *tomato spotted wilt virus*, and *potyviruses* infecting orchids in Hawaii. Plant Dis. 77:464-468.
- Inouye, N. 1983. Host range and properties of a strain of *Odontoglossum ringspot virus* in Japan. Nogaku Kenkyu 60:53-67.
- Kondo, H., Maeda, T. and Tamada, T. 2003. *Orchid fleck virus*: Brevipalpus mite transmission, biological properties and genome structure. Exp. Appl. Acarol. 30:215-223.
- Lawson, R. H., and Hsu, H. T. 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.
- Paul, H. L. 1975. *Odontoglossum ringspot virus*. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 155.
- Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., and Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Disease 74:621-625.