

幾種作物病毒之快速診斷技術

楊佐琦 副研究員兼課長、王慧如 研究助理、邱燕欣 聘用助理
行政院農委會種苗改良繁殖場
電子郵件：tcyang@tss.gov.tw；傳真：04-25825819

摘 要

以百合、蘭花及彩色海芋等作物病害為例，分別介紹其病徵、生物檢定法、光學顯微鏡鏡檢技術、電子顯微鏡鏡檢技術、血清診斷法及聚合酶連鎖反應等快速診斷方法，為讓植物病毒診斷工作能更快、精準與可靠，建議以兩種以上不同診斷方法為檢定基準。

關鍵詞：病徵、生物檢定法、光學顯微鏡鏡檢技術、電子顯微鏡鏡檢技術、血清診斷法及聚合酶連鎖反應

Quick Diagnosis Methods for Viruses of Several Crops

Tso-Chi Yang, PhD, Associate Researcher; Hui-Ru Wang, Research Assistant; Yen-Shin Chiu, Assistant

Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, Council of Agriculture

Email: tcyang@tss.gov.tw; Fax: 04-25825819

Abstract

Several diagnosis methods used for viruses of lily, orchids, and calla lilies are introduced in this article. There are symptomatology, bioassay, light microscopy, electron microscopy, serology and polymerase chain reaction and each has advantages and disadvantages respectively. For rapid, accurate, and reliable purpose, we suggest at least two diagnosis means should be used.

Key words: symptomatology, bioassay, light microscopy, electron microscopy, serology and polymerase chain reaction (PCR)

緒 言

根據美國農部評估全球作物因病害所造成之經濟損失，每年估計在 600 億美元；其中因病毒病害所引起之損失僅次於真菌性病害所造成之損失，估計共有 150 億美元。而這些較重大之損失大多發生於亞熱帶與熱帶國家，推測原因可能與這些國家栽培技術較落後、媒介昆蟲之快速衍生或病毒病害之診斷技術較差有關（楊，1998）。

防治植物病毒病害之首要工作必須要鑑定引起病毒病害之病毒之種類及瞭解其一些生物與生態特性，經過多年來之研究，鑑定病毒之工作因為兩方面之發展及進步而日趨簡單。首先，在國際病毒分類委員會(International Committee on Taxonomy of Viruses；簡稱 ICTV)多年之整理、分類、歸納下，將植物病毒分成科、屬、種（表一），提供了鑑定植物病毒之完整架構。

作物病毒種類繁多，根據文獻報導，大約有 10 餘種病毒可感染百合，其中百合 X 病毒(*Lily virus X*; LVX)、百合隱微型病毒(*Lily symptomless virus*; LSV)、胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*; CMV)及鬱金香條斑病毒(*Tulip breaking virus*; TBV)或是百合斑駁病毒(*Lily mottle virus*; LiMoV)是最常見的四種病毒，而其它的病毒如 *Arabidopsis mosaic virus*, *Strawberry latent ringspot virus*, *Narcissus mosaic virus*, *Tobacco rattle virus*, *Tomato ringspot virus*, *Citrus tatter leaf virus* 與 *Broad bean wilt virus* 等（Yang, 1997）。

可以感染蘭屬植物之病毒種類超過 25 種以上，約計有 *Bean yellow mosaic virus*、*Brazilian bacilliform virus*、*Clover yellow vein virus*、*Cucumber mosaic virus*、*Cymbidium mild mosaic virus*、*Cymbidium mosaic virus*、*Cymbidium ringspot virus*、*Dendrobium habodovirus*、*Dendrobium mosaic virus*、*Dendrobium vein necrosis virus*、*Filamentous Cypripedium virus*、*Filamentous Orchid virus*、*Grammatophyllum bacilliform virus*、*Isometric Masdevallia virus*、*Leilia red leafspot virus*、*Long orchid rhabdovirus*、*Odontoglossum ringspot virus*、*Orchid fleck virus*、*Phalaenopsis chlorotic spot virus*、*Phalaenopsis chlorotic necrosis spot virus*、*Spiranthes mosaic virus*、*Short orchid Rhabdovirus*、*Tobacco rattle virus*、*Tomato ringspot virus*、*Tomato spotted wilt virus*、*Turnip mosaic virus*、*Vanilla mosaic virus* 及 *Vanilla necrosis virus*。然以最重要並最普遍發生之蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)與齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)最為經濟栽培者所關注，亦為本文研究之重點（Zettler *et al.*, 1990；張等，1999）。

根據文獻記載曾危害天南星科植物之病毒有番茄斑點萎凋病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、bobone rhabdovirus、香蕉萎縮病毒(*Banana bunchytop virus*, BBTV)、蒟蒻嵌紋病毒(*Konjak mosaic virus*, KoMV)、芋頭羽狀斑駁病毒(*Taro feathery mottle virus*, TFMoV)、芋頭嵌紋病毒(*Dasheen mosaic virus*, DsMV)，以及最近在海芋上新發現之海芋嵌紋病毒(*Zantedeschia mosaic virus*, ZaMV)、蕪菁嵌紋病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)、海芋微嵌紋病毒(*Zantedeschia mild mosaic virus*, ZaMMV)、洋桔梗壞疽病毒(*Lisianthus necrosis virus*, LNV)、康乃馨斑駁病毒(*Carnation mottle virus*, CarMV)以及彩色海芋黃化輪點病毒(*Calla lily chlorotic ringspot virus*, CCRV)（楊，2004）。

植物病毒的診斷技術之不斷進步，例如核酸探針雜交技術(Nucleic Acid Hybridization)、聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)的發展，光學顯微鏡鏡檢技術(Light Microscopy)、電子顯微鏡鏡檢技術(Electron Microscopy)及血清診斷法(Serology)之改進等皆對植物病毒病害防治有極大貢獻。

病徵診斷法 (Symptoms)

在東方型百合-Strawberry shortcake 品種上發現葉燒及花瓣壞疽的病徵，由 LSV 及 LVX 複合感染造成的病徵。LiMoV 或 TBV 單獨感染之百合葉片出現淡綠或黃綠相間之嵌紋病徵，葉片有時會捲曲變細，植株通常會矮化、提前死亡，瓶花壽命亦變短，花瓣有時會畸形或出現條斑等現象，有些品種之鱗片甚至於會出現褐色壞疽斑或輪點；當有百合隱微型病毒複合感染時，病徵會變得更嚴重，葉片出現壞疽條斑、黃化等病徵。CMV 單獨感染之百合葉片出現黃斑、黃條或葉脈透化等病徵，後期灰色或褐色壞疽病斑可能出現，有時葉片與花瓣捲曲變形。當有 LSV 複合感染時，葉片會出現明顯的白色塊斑或條斑，葉片捲曲及植株矮化(楊，2000)。

感染 CymMV 之蝴蝶蘭有產生壞疽型病徵之傾向，病徵如黑色壞疽斑點(spots)及壞疽條紋(line patterns)等，產生之部位除葉部外，花部亦有可能出現壞疽而影響外觀。壞疽斑有時僅出現於葉片下表面，而不發生於上表面，故常被誤認為真菌感染所致。部分蘭屬感染 CymMV 後，亦會產生黃綠斑駁之嵌紋(mosaic)或黃化條斑型(chlorotic streak)病徵，惟有些蘭花種類於感染 CymMV 後並不表現任何可辨識病徵，此種現象特別常見於蝴蝶蘭及文心蘭。目前絕大多數市場熱門品系之蝴蝶蘭，即使已感染 CymMV，惟在苗期並不會表現病徵，通常至開花後植株衰弱時，病徵才逐漸顯現。雖然蘭株在生育旺期感染 CymMV 不表現病徵，但事實上其生育速度與植株大小可能都已受到抑制，對肥料之反應亦會較正常植株遲鈍。根據文獻報告，可被 ORSV 感染之蘭花種類超過 20 個屬以上，不同之蘭屬或種所產生之病徵常有差異。ORSV 最早在 *Odontoglossum grande* 上被發現時，所記載之病徵為輪斑(ringspot)，此外嵌紋(mosaic)、斑紋(mottle)、黃化條紋(chlorotic streak)、花色條斑(color breaking)、甚至壞疽型(necrosis)等病徵，均有紀錄。一般而言，ORSV 在蝴蝶蘭上產生黃綠斑駁之嵌紋型病徵之傾向較 CymMV 為高，尤其單獨感染 ORSV 之蝴蝶蘭通常不會有壞疽型之病徵出現。惟有部分蝴蝶蘭品系單獨感染 ORSV 後並不表現病徵，僅於開花後植株衰弱時才顯現病徵。此外，ORSV 與 CymMV 複合感染同一株蘭花後，會促使病徵加重，罹病組織內病毒濃度因相乘作用而大幅提高，此種病株具極高之傳染性(張，2005)。病株感染病毒後，由於栽培品種、栽培環境、施肥管理及遺傳因子變異等影響，病徵的表現並不一致，有些植株甚至不表現任何病徵，因此很難單憑病徵之表現來判斷植株是否感染病毒(Lawson and Hearon, 1973; 王等，2000)。

感染 DsMV 之海芋通常於葉片產生黃綠斑駁之嵌紋(mosaic)病徵，病徵之嚴重程度與品系之抗病性、病毒系統、環境溫度與植株之肥培管理狀況等皆有關，一般而言無病

毒植株第一次遭受 DsMV 感染時病徵通常較為輕微，然而其種球第二年栽培後病勢便逐漸加重，種球帶毒者植株發芽後不僅葉片嵌紋病徵嚴重，葉部畸形，且植株矮化，所抽生花軸長度減短，黃花品種者花瓣上有褪色斑塊，部份紅花品種則產生明顯褪色條紋、斑點及斑塊，甚至花型不整，失去商品價值。感染 ZaMV 之海芋通常於葉片產生黃綠斑駁之嵌紋與綠島狀病徵，嚴重時葉部畸形，且植株矮化，花梗減短，花苞著色不均，甚至畸形現象失去商品價值。CMV 感染之彩色海芋，呈現斑紋病徵，亦有花苞著色不均現象。(楊，2004)。

生物檢定法 (Bioassay)

百合隱微型病毒無指示植物可供診斷，有些百合斑駁病毒分離株可經汁液傳播方式感染菸草(*Nicotiana benthamiana*)、番杏(*Tetragonia expansa*)與紅藜(*Chenopodium amaranticolor*)等指示植物，台灣百合(*Lilium formosanum*)為此病毒之最佳指示植物，汁液摩擦接種後出現嵌紋病徵，葉片有時會捲曲變細，植株矮化，開花亦變慢，花瓣有時會畸形現象。有些 LVX 分離株可經汁液傳播方式感染菸草(*Nicotiana clevelandii*)、番杏、與千日紅(*Gomphrena globosa*)等指示植物。CMV 可經汁液傳播方式感染菸草(*Nicotiana spp.*)、胡瓜(*Cucumis sativus*)、百日草(*Zinnia elegans*)與紅藜等指示植物 (Yang, 1997; 楊，2000)。

蘭花病毒之生物檢定是將蘭花之汁液，摩擦接種於指示植物 (紅藜 *Chenopodium amaranticolor*、圓葉菸草 *Nicotiana benthamiana*、千日紅 *Gomphrena globosa* 與望江南 *Cassia occidentalis*)，視病徵表現來判斷是否有病毒感染，但需時一至三週，一般較不被採用於大量樣品之檢定用 (柯，1982)。柯 (1982) 指出 CymMV 與 ORSV 皆可感染紅藜，病斑不易分辨；而望江南葉上只能形成細小且不顯眼之褐斑，診斷上較易忽略而誤診；千日紅及圓葉菸草則為極佳之 ORSV 指示植物。揚等 (2006) 發現 CymMV 並不單獨感染紅藜、奎藜、千日紅，ORSV 並不感染望江南，同時可觀查出 CymMV 與 ORSV 彼此有協力感染指示植物之現象。

光學顯微鏡鏡檢病毒內含體技術 (Light Microscopy)

每種植物病毒的診斷技術各有其優缺點，其中具有快速、可靠與相當便宜特性之病毒內含體(Virus Inclusion)診斷技術非常適用於田間病毒病害之迅速診斷。以檢查病毒內含體為主之光學顯微鏡鏡檢技術，目前已在美國之植物病害診斷中心(Plant Disease Clinic)被廣泛應用，此種植物病毒之簡易診斷技術，乃是依據下列病毒內含體之特性而判定病毒之屬(Genus)或種(Species)：(1)病毒形成內含體之類別：病毒聚集而成之內含體(Virus particles)；例如菸草嵌紋病毒群(*Tobamovirus*)、非鞘蛋白之蛋白質聚集而成之內

含體(Nonstructural protein)；例如馬鈴薯 Y 屬病毒(*Potyvirus*)及被改變之細胞組成物(altered cell constituent)；例如番茄矮化病毒屬(*Tombusvirus*)等；(2) 病毒內含體在細胞內之位置：細胞質(例如馬鈴薯 Y 屬病毒之細胞質圓筒狀內含體，馬鈴薯 X 屬病毒之板狀內含體)及細胞核(雙子星病毒屬，*Geminivirus*)；(3) 病毒內含體對組織之專一性：胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*)存在於葉肉組織或柑桔萎縮病毒(*Citrus tristeza virus*)存在於韌皮部組織(楊，1998)。

此種簡易植物病毒診斷法只需要下列簡單之儀器、材料與試劑：可放大 1000 倍、有油鏡頭的複式光學顯微鏡、橙綠蛋白質染劑(一滴 0.1% Calcomine orange/溶於 2-Methoxyethanol + 八滴 0.1% Brilliant green/溶於 2-Methoxyethanol + 一滴蒸餾水)及紫紅核酸染劑(九滴 0.1% Azure A/溶於 2-Methoxyethanol + 一滴 Na_2HPO_4)、透化劑(5% Triton X-100)、脫色定色劑(70% 2-Methoxyethyl acetate : 30% ethanol)、定色劑(2-Methoxyethyl acetate)、封片劑(Euparal 或 LR White)、載玻片、蓋玻片、染色瓷砵皿、洗滌瓶、吸管、解剖刀與 5 號尖尾鑷子等(楊，1998)。

一般染色步驟如下：以 5 號尖尾鑷子撕取植株表皮細胞、含韌皮細胞之葉脈組織或用刮鬍刀刀片切取表皮細胞等，置於含有上述之橙綠蛋白質染劑或紫紅核酸染劑的染色瓷砵皿中，於微波爐(800 瓦特)中加熱 10-15 秒鐘，先以吸管將多餘染液吸去，再加入脫色定色劑靜置 10-15 秒鐘，最後將染色好之組織片移入滴有封片劑之載玻片，蓋上蓋玻片後於光學顯微鏡下檢查。茲將重要植物病毒屬之內含體及其染色特性整理列表如下(表二)，特供大家診斷時作為參考(楊，1998)。

楊等(2004)於微波爐(720 瓦特)中加熱 20 秒鐘染色時間下，ORSV 在細胞質中形成之披針狀結晶型內含體，被橙綠蛋白質染劑染成綠色-橄欖綠色；但於微波爐中加熱 20 秒鐘下，內含體不被紫紅核酸染劑染上顏色，須以微波爐(720 瓦特)中加熱 20 秒鐘後再行加熱 20 秒鐘後，則大多可染成紫紅色。此改良方法可降低傳統以 60 °C 染色 10 分鐘之缺失(Christie and Edwardson, 1977)，同時縮短染色時間與增進染色效果。另外，於微波爐(720 瓦特)中加熱 20 秒鐘下，CymMV 則在細胞壁附近形成似帶狀之內含體，被橙綠蛋白質染劑染成綠色，亦被紫紅核酸染劑染成紫紅色。內含體之帶狀結構須經戊二醛固定處理才能觀察(Christie and Edwardson, 1977)，在一般診斷上則不需要(圖一)。

在百合病毒之細胞學研究，在光學顯微鏡下，無論鬱金香條斑病毒(TBV)或百合斑駁病毒(LiMoV)皆在感染之百合表皮細胞中形成細絲狀之細胞質內含體，LVX 在感染之百合表皮細胞中形成紡錘狀擬結晶形內含體，胡瓜嵌紋病毒(CMV)在感染之百合表皮細胞或葉肉組織細胞中形成六角形或多角形之結晶狀內含體，染色時內含體常中空透化，LSV 則在感染之百合表皮細胞中形成披針狀之擬結晶形內含體與胞囊狀內含體，此細胞化學上之染色特性可供診斷用(圖二)(Yang, 1997)。

此診斷方法約只需 5 分鐘內即能完成一個樣品之診斷，非常方便而可靠，但缺點是不適宜大量檢定且極需細胞學與病毒分類之專業與訓練。然而對於從事新作物病毒病害研究、無抗血清可供檢查或抗血清非常昂貴之情形下，此種簡易植物病毒診斷能迅速診斷病毒病害、縮小病毒鑑定範圍，亦可幫助加速病毒其他如病毒純化、血清製作或電子顯微鏡方面等之研究。另外此技術對於進口檢疫之把關工作極有裨益，能迅速瞭解進口植物種苗(球)是否攜帶病毒?是何類群之病毒?然後再用專一性高之抗血清或 DNA 探針

加以確認，防堵特定傳染性病毒之入侵與為害我國農業。

電子顯微鏡技術 (Electron Microscopy)

柯 (1982) 將蘭花病葉汁液經 VaMo 陰染後，在電子顯微鏡下觀察時，於陰染液周圍看到多量 272×16 nm 之 ORSV 病毒粒子。此法亦不能應用於大量樣品之病毒檢定。CymMV 為馬鈴薯 X 病毒屬 (*Potexvirus*) 之成員，其顆粒體為微彎曲之桿狀，長度約 450 nm。ORSV 為煙草嵌紋病毒屬 (*Tobamovirus*) 之一員，顆粒體為短直立桿狀，長度約 300 nm，據此以陰染法可診斷出二種蘭花病毒形狀及長度上之差異 (揚等，2006)。

在電子顯微鏡下觀察病組織超薄切片，TBV 與 LiMoV 皆在百合細胞中形成風車狀細胞質內含體 (pinwheel)，並且有束狀 (bundle) 及圓捲狀 (Scrolls)，但並無板狀 (laminar) 的凝聚物。因此據光學顯微鏡及電子顯微鏡的結果，鬱金香條斑病毒與百合斑駁病毒皆屬馬鈴薯 Y 群病毒之第一類 (Subdivision I) 細胞質內含體，此內含體含風車狀、束狀及圓捲狀，但並無板狀 (laminar) 的凝聚物 (Yang, 1997)。

免疫膠金標示法 (immunogold labeling) 可在電子顯微鏡及光學顯微鏡技術上用來區分 LVX 及 LSV。10 nm 膠金粒子標示在有 LVX 抗血清黏附的 LVX 病毒顆粒上，病毒粒子長約 550nm，此 LVX 抗血清無法與 LSV 病毒顆粒反應。而長約 750nm 之 TBV 病毒粒子上裝飾有 TBV 抗血清及 10 nm 膠金粒子。同理長約 650nm 之 LSV 病毒粒子上只專一性的裝飾上 LSV 抗血清及 10nm 膠金粒子 (Yang, 1997)。

血清檢定法 (Serology Methods)

酵素聯結抗體免疫測定法 (ELISA) 已被廣為應用於檢定各種作物病毒病害，此法已被廣為使用於大量之蘭花、百合、海芋等病毒檢查，其結果穩定，可信度高 (Yang, 1997; 楊等，2004)。

直接組織墨點法 (Direct tissue blotting) 被廣泛應用於柑橘、竹子及大蒜病毒之檢定。如果將病毒感染的組織橫切片點在硝化纖維紙上，再以同源抗血清、酵連抗體及呈色劑分別反應後，即在紙上呈現紫色的反應。而健康或異源的抗原則不會呈色。以此法測試，結果顯示出百合 4 種病毒分佈在鱗莖的鱗片、基盤及根部，而健康的對照組無呈色反應。比較兩種血清偵測技術的偵測效率，直接組織墨點法比用酵連抗體免疫測定法 (ELISA) 能測得更多的樣品，顯然直接組織墨點法比酵連抗體免疫測定法更靈敏。(Yang, 1997; 楊，2000)。

胡等 (2004) 開發蘭花病毒診斷試劑套組，按照套組中操作步驟，利用 Tissue immunoblotting 原理呈色反應診斷蘭花之 CymMV 與 ORSV，操作簡易全程只需 1-2 小時，缺點是信號弱時不易判讀，每盒僅能測定 9 個樣品。

分生檢測技術 (Molecular Assay)

楊等 (2004) 利用一步驟、一組引子對同時檢定二種病毒之方法，遂另外以 Seoh *et al.* (1998) 設計可同時偵測 CymMV 及 ORSV 之一組引子對 C+O U1/L1，從 CymMV 感染植株所萃取之總量 RNA，經 RT-PCR 後增幅出一約 534 bp 的 CymMV 之 DNA 產物；ORSV 感染植株所萃取之總量 RNA，則增幅出約 290 bp 的 ORSV 之 DNA 產物，而於健康對照植株所萃取之總量 RNA 則未獲得任何類似產物，此結果與 Seoh 等人 (1998) 之結果相同。

筆者等萃取之病毒感染植株之山藥全量 RNA，先利用 POTYD341、POTYU341 primer (Langeveld *et al.*, 1991) 進行 RT-PCR 反應。結果發現病毒株-台農 2 號 (#15)、陽明山刺薯 (#21)、中埔紅薯 (#30)、銀杏薯 (#27、#28) 有增幅出 341 bp 的基因片段。再將陽明山刺薯 (#21)、中埔紅薯 (#30)、銀杏薯 (#27)、銀杏薯 (#28) 的 RT-PCR 產物 insert T-Vector DNA 中，再轉殖於大腸桿菌 (*E.coli* DH 5 α) 培養於含 Kanamycin 的 L.B. 培養皿中，分別挑出單一菌落，再進行 PCR 反應，確認經電泳發現陽明山刺薯 (#21) 有 4 個轉殖成功，中埔紅薯 (#30) 則有 2 個、銀杏薯 (#27) 有 5 個轉殖成功，銀杏薯 (#28) 則有 8 個轉殖成功。培養抽取 plasmid DNA 再進行定序 PCR，陽明山刺薯 (#21) 與中埔紅薯 (#30) 定序送至 NCBI 比對結果為 *Yam mild mosaic virus*。銀杏薯 (#27) 及銀杏薯 (#28) 定序送至 NCBI 比對結果為 *Japanese Yam mosaic virus* (未發表之資料)。此法以簡併型引子，先以 RT-PCR 增幅出疑似 Potyvirus 的 DNA 產物，再進行選殖、定序、基因庫比對，確定病毒之種類。

討 論

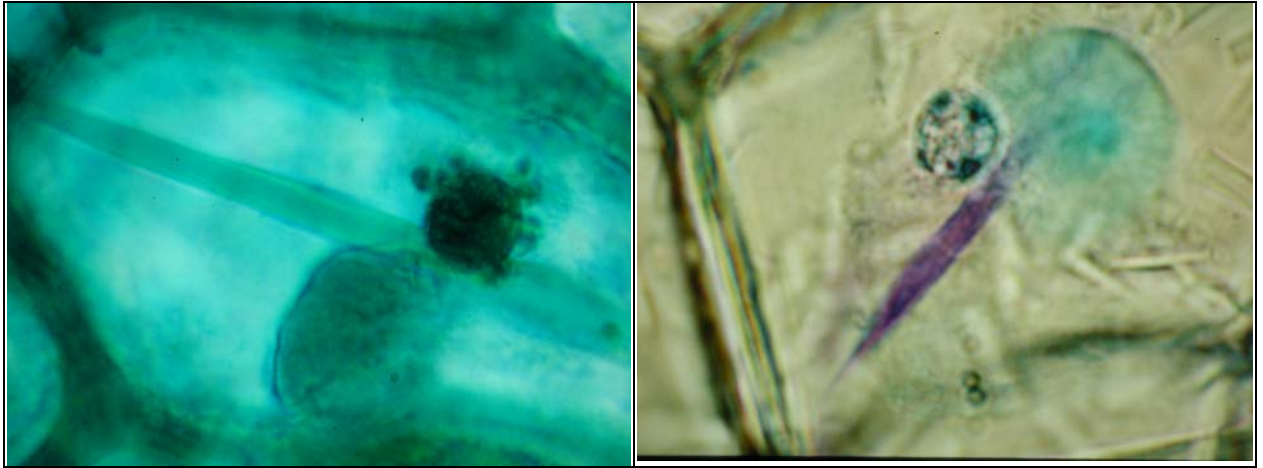
Elliot 等人 (1996) 闡明以血清方法檢定蘭花病毒時，判讀植株是健康或感染病毒時有許多困擾，以 ELISA 法檢定為例，一般接受之正反應臨界值通常設為健康讀值之 2-4 倍，但在蘭科植物之遺傳異源性下，有時正常血清(免疫注射前)會與 *Vinilla*、*Gongora* 或 *Stanhopea* 等屬健康汁液起非專一性反應，因此建議以兩種以上不同檢定方法為檢定基準，避免丟棄了健康植株；並應建立較受栽培者、消費者喜愛之品種(系)的健康及感病植株，作為每次檢定時的正、負對照用(揚等，2006)。

依筆者淺見，當務之急應(1)儘快蒐集、建立各重要進出口農作物之病毒種類資料庫，(2)建立重要檢疫病毒之診斷方法與圖譜，(3)建立病毒之正、負對照材料保存園(庫)，(4)邀請海外知名病毒學家舉辦簡易植物病毒診斷研習會等，加強病害診斷第一線工作人員之診斷訓練及經驗，如此方能保障我國農業產品之優良品質以及提升與外國之競爭力。

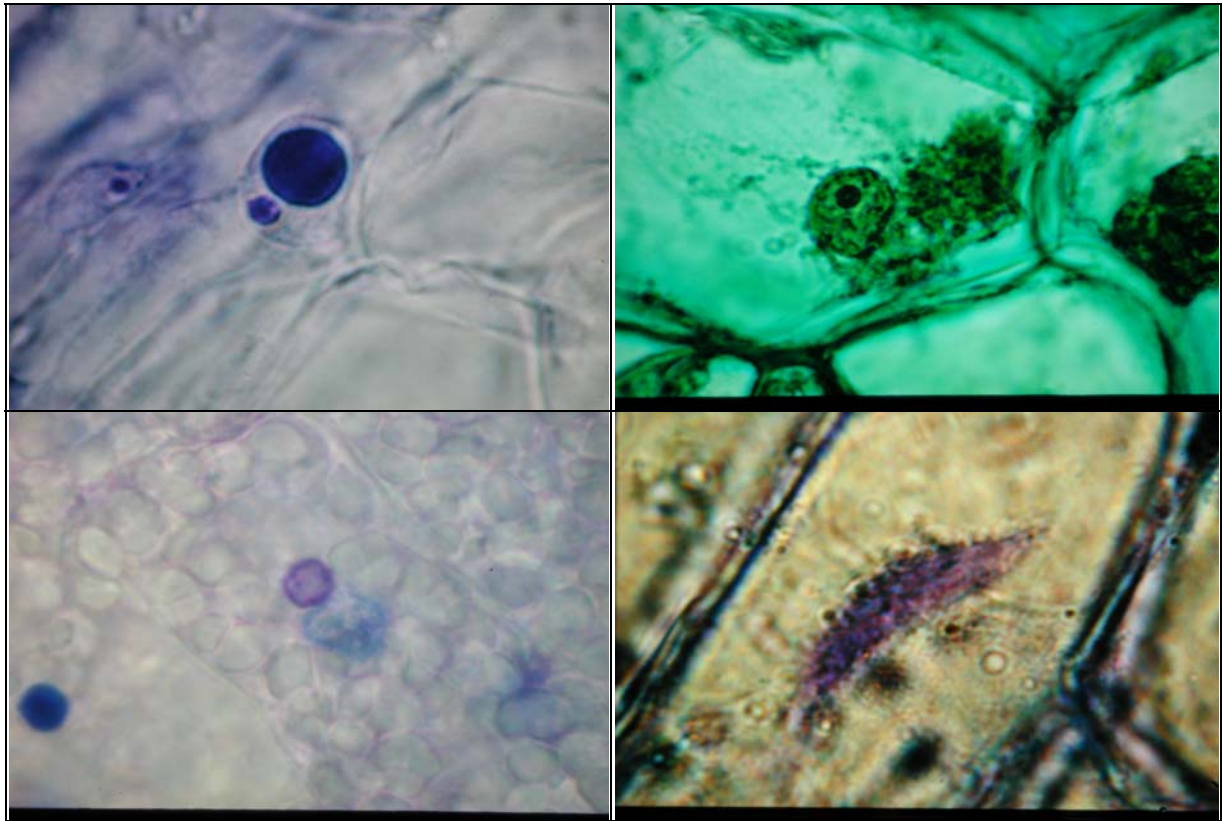
表一、2004 年國際病毒分類委員會 (ICTV) 通過之植物病毒科、屬、種名稱

目 (Order)	科 (Family)	屬 (Genus)	標準種 (Type species)
		<i>Benyvirus</i>	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
	Bromoviridae	<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
		<i>Ilavirus</i>	<i>Tobacco streak virus</i>
		<i>Bromovirus</i>	<i>Brome mosaic virus</i>
		<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>
		<i>Oleavirus</i>	<i>Olive latent virus</i>
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
	Caulimoviridae	<i>Badnavirus</i>	<i>Commelina yellow mottle virus</i>
		<i>Caulimovirus</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
		<i>Tungrovirus</i>	<i>Rice tungro bacilliform virus</i>
		<i>Soymovirus</i>	<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>
		<i>Cavemovirus</i>	<i>Cassava vein mosaic virus</i>
		<i>Petunivirus</i>	<i>Petunia vein clearing virus</i>
	<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Beet yellow virus</i>
		<i>Crinivirus</i>	<i>Lettuce infectious yellows virus</i>
		<i>Ampelovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>
	<i>Comoviridae</i>	<i>Comovirus</i>	<i>Cowpea mosaic virus</i>
		<i>Fabavirus</i>	<i>Broad bean wilt virus 1</i>
		<i>Nepovirus</i>	<i>Tobacco ringspot virus</i>
	Flexiviridae	<i>Allxivirus</i>	<i>Shallot virus X</i>
		<i>Manadrivirus</i>	<i>Indian citrus ringspot virus</i>
		<i>Carlavirus</i>	<i>Carnation latent virus</i>
		<i>Capilloviri</i>	<i>Apple stem grooving virus</i>
		<i>Foveavirus</i>	<i>Apple stem pitting virus</i>
		<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i>
		<i>Trichovirus</i>	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
		<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine virus A</i>
		<i>Furovirus</i>	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i>
	Geminiviridae	<i>Matrevirus</i>	<i>Maize streak virus</i>
		<i>Curtovirus</i>	<i>Beet curly top virus</i>
		<i>Begomovirus</i>	<i>Bean golden mosaic virus-Puerto Rico</i>
		<i>Hordeivirus</i>	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
		<i>Idaeovirus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>
	<i>Luteoviridae</i>	<i>Luteovirus</i>	<i>Barley yellow dwarf virus-PAV</i>
		<i>Polerovirus</i>	<i>Potato leafroll virus</i>
		<i>Enamovirus</i>	<i>Pea enation mosaic virus-1</i>
	<i>Nanoviridae</i>	<i>Nanovirus</i>	<i>Subterranean clover stunt virus</i>
		<i>Bubuvirus</i>	<i>Banana bunchy top virus</i>
		<i>Ophiovirus</i>	<i>Citrus psorosis virus</i>
		<i>Ourmiavirus</i>	<i>Ourmia melon virus</i>
	<i>Partitiviridae</i>	<i>Alphacryptovirus</i>	<i>White clover cryptic virus 1</i>

		<i>Betacryptovirus</i>	<i>White clover cryptic virus 2</i>
		<i>Pecluvirus</i>	<i>Peanut clump virus</i>
		<i>Pomovirus</i>	<i>Potato mop-top virus</i>
	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y</i>
		<i>Rymovirus</i>	<i>Ryegrass mosaic virus</i>
		<i>Bymovirus</i>	<i>Barley yellow mosaic virus</i>
		<i>Macluravirus</i>	<i>Maclura mosaic virus</i>
		<i>Ipomovirus</i>	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>
		<i>Tritimovirus</i>	<i>Wheat streak mosaic virus</i>
	<i>Reoviridae</i>	<i>Fijivirus</i>	<i>Fiji disease virus</i>
		<i>Phytoreovirus</i>	<i>Rice dwarf virus</i>
		<i>Oryzavirus</i>	<i>Rice ragged stunt virus</i>
Mononegavirales	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Cytorhabdovirus</i>	<i>Lettuce necrotic yellows virus</i>
		<i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>Potato yellow dwarf virus</i>
Satellites			<i>Tobacco necrosis virus satellite</i>
	<i>Sequiviridae</i>	<i>Sequivirus</i>	<i>Parsnip yellow fleck virus</i>
		<i>Waikavirus</i>	<i>Rice tungro spherical virus</i>
		<i>Sobemovirus</i>	<i>Southern bean mosaic virus</i>
		<i>Tenuivirus</i>	<i>Rice stripe virus</i>
		<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>
		<i>Tobravirus</i>	<i>Tobacco rattle virus</i>
	<i>Tombusviridae</i>	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
		<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i>
		<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus A</i>
		<i>Dianthovirus</i>	<i>Carnation ringspot virus</i>
		<i>Machlomovirus</i>	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>
		<i>Avenavirus</i>	<i>Oat chlorotic stunt virus</i>
		<i>Aureovirus</i>	<i>Pothos latent virus</i>
		<i>Panicovirus</i>	<i>Panicum mosaic virus</i>
	<i>Tymoviridae</i>	<i>Tymovirus</i>	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
		<i>Marafivirus</i>	<i>Maize rayado fino virus</i>
		<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus</i>
		<i>Umbravirus</i>	<i>Carrot mottle virus</i>
		<i>Varicosavirus</i>	<i>Lettuce big-vein associated virus</i>
<i>Viroid</i>	<i>Pospiviroidae</i>	<i>Pospiviroid</i>	<i>Potato spindle tuber viroid</i>
		<i>Hostuviroid</i>	<i>Hop stunt viroid</i>
		<i>Cocadviroid</i>	<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>
		<i>Apscaviroid</i>	<i>Apple scar skin viroid</i>
		<i>Coleviroid</i>	<i>Coleus blumei viroid 1</i>
	<i>Avsunviroidae</i>	<i>Avsunviroid</i>	<i>Avocado sunblotch viroid</i>
		<i>Pelamoviroid</i>	<i>Peach latent mosaic viroid</i>



圖一、齒舌蘭輪斑病毒（ORSV）在蝴蝶蘭表皮細胞之細胞質中形成披針狀及圓盤狀結晶型內含體，被橙綠蛋白質染劑（Orange-Green Combination）染成綠色（左），披針狀結晶型內含體被紫紅核酸染劑(Azure A)染成紫紅色（右）。



圖二、番茄黃化捲葉病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*) 在番茄葉脈薄壁細胞之細胞核中形成結晶型內含體，因含 DNA 被紫紅核酸染劑(Azure A)染成藍色 (左上)，海芋嵌紋病毒 (*Zantedeschia mosaic virus*) 在彩色海芋表皮細胞之細胞質中形成圓桶狀內含體，橙綠蛋白質染劑 (Orange-Green Combination) 染成綠色 (右上)，胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*) 在彩色海芋葉肉薄壁細胞之形成中空多角型結晶型內含體，因含 RNA 被 Azure A 染成紫紅色 (左下)，百合 X 病毒 (*Lily virus X*) 在百合表皮細胞之細胞質中形成擬結晶型內含體被 Azure A 染成紫紅色 (右下)。

表二、重要植物病毒屬之內含體及其染色特性

甲) 病毒內含體分佈全植株之病毒屬

病毒屬 -virusres	內含體	供診斷用內 含體	Triton X-100	橙綠蛋白 質染劑	紫紅核酸 染劑	附註
Carla-	細胞質 1)胞囊狀 2)擬結晶狀 3)液泡膜聚集	1)胞囊狀 2)擬結晶狀	1)抗 2)分解 3)分解	1)橙綠色 2)綠色 3)綠色	1)紫紅色 2)紫紅色 3)紫紅色	1) 普遍存在 2) 有些是帶狀的 3) 病毒易在液泡 膜聚集並突向 中液泡
Caulimo-	細胞質 1)有小胞囊之 圓形或橢圓 形體 其他 2)細胞核	1)有小胞囊 之圓形或橢 圓形體	1)抗 2)抗	1) 綠色 2)綠色	1)紫紅色 2)紫紅色	<u>胞囊內含 DNA 病毒，被紫紅核 酸染劑染成藍色</u>
Como-	細胞質 1)胞囊狀 2)病毒結晶及 聚集 3)木質部阻塞 與結晶	1)胞囊狀 2)病毒結晶 及聚集 3)木質部阻 塞	1)抗 2)(抗) 3)抗	1)橙綠色 2)綠色 3)綠色	1)紫紅色 2)紫紅色 3)紫紅色	1) 感染早期有 胞囊狀 2) 存在腺毛細 胞、保衛細胞 及韌皮部之 薄壁細胞 3) <u>木質部阻塞 與結晶是此 病毒群與 Sobemovirus 群之特色</u>
Cucumo-	細胞質 1)胞囊狀 2)病毒結晶及 聚集	1)胞囊狀 2)病毒結晶 及聚集	1)抗 2)(抗)	1)橙綠色 2)綠色	1)紫紅色 2)紫紅色	1) 胞囊狀內含 體形態與大 小與質體相 似，但質體會 被 Triton X-100 分解 2) <u>胡瓜嵌紋病 毒結晶狀內 含體為中空</u>
Furo-	細胞質 1)病毒聚集及 擬結晶 其他 2)大且長形之 液泡		1)(抗) 2)抗	1)橙綠色 2)棕色	1)紫紅色 2)紫紅色	<u>擬結晶內含體不 必加熱及可被紫 紅核酸染劑，此 特性與 tobamovirus 不同</u>

Nepo-	細胞質 1)胞囊狀 2)病毒結晶及聚集		1)抗 2)(抗)	1)橙綠色 2)綠色	1)紫紅色 2)紫紅色	1) 胞囊狀內含體只在感染初期出現 2) <u>當病徵消失時病毒仍存在於分生組織</u>
Pea enation mosaic	細胞質 1)不規則形，通常近細胞核 2)結晶狀 3)細胞核擴張	1) 不規則形，通常近細胞核 2)結晶狀 3)細胞核擴張	1)分解 3)抗	1)綠色 2)綠色 3)綠色	1)紫紅色 2)紫紅色 3)紫紅色	不規則形細胞質內含體與細胞核內含體出現於增生組織區域
Potex-	細胞質 1)帶狀內含體 2)厚紡錘狀 其他 3)胞囊狀 4)板層狀	1)帶狀內含體 2)厚紡錘狀	1)分解 2)分解 3)抗 4)抗	1)橙綠色 2)橙綠色 3)橙綠色 4)橙綠色	1)紫紅色 2)紫紅色 3)紫紅色 4)紫紅色	<u>帶狀內含體是馬鈴薯 X 病毒群之診斷特色，但常需事先固定。板層狀內含體是馬鈴薯 X 病毒之特徵。</u>
Poty-	細胞質 1)圓筒狀(蛋白質)內含體含管狀(第一及第四類) 2)圓筒狀(蛋白質)內含體含板狀(第二類) 3)圓筒狀(蛋白質)內含體含管狀及板狀(第三類)	1)圓筒狀(蛋白質)內含體含管狀(第一及第四類) 2)圓筒狀(蛋白質)內含體含板狀(第二類) 3)圓筒狀(蛋白質)內含體含管狀及板狀(第三類)	1)抗 2)抗 3)抗	1)綠/棕色 2)綠/棕色 3)綠/棕色	1)無 2)無 3)無	<u>蛋白質圓筒狀內含體是馬鈴薯 Y 病毒群之診斷特色，此外此群病毒有些亦產生其他細胞質與細胞核內含體。</u>
Rhabdo-	細胞質： 1)不規則形 細胞核： 2)圓形的病毒聚集 3)不規則形病毒質狀	細胞核： 2)圓形的病毒聚集 3)不規則形病毒質狀	1) 抗 2) 抗	1) 綠 2) 綠	2)淡紅 3)紫紅色	1) 許多此群病毒形成不規則形病毒質狀，但不被兩種染劑染色。 2) 感染後期此圓形之細胞

						核內含體散去或消失，使細胞核感覺空洞化。 3) 感染初期常可觀察到此種內含體。
Sobemo-	細胞質： 1) 胞囊狀 2) 病毒結晶及聚集 3) 木質部阻塞與結晶	1) 胞囊狀 2) 病毒結晶及聚集 3) 木質部阻塞與結晶	1) 抗 2) (抗) 3) 抗	1) 橙綠色 2) 綠色 3) 綠色	1) 紫紅色 2) 紫紅色 3) 紫紅色	1) 常在感染初期可觀察到胞囊狀內含體，通常比細胞核大。 2) 存在腺毛細胞、保衛細胞及韌皮部之薄壁細胞。 3) <u>木質部阻塞與結晶</u> 是此病毒群與 <u>Comovirus 群之特色</u> 。
Tenui-	細胞質 1) 絲狀物之聚集	1) 絲狀物之聚集	抗	綠色	微紅色	<u>極易在表皮組織測得此內含體，且不被紫紅核酸染劑所染，因此此內含體可能是蛋白質。</u>
Tobamo-	細胞質 1) 病毒結晶及聚集：a) 俯視為六角形，側視時為四角形 b) 俯視為圓盤形 c) 絲狀聚集物 其他 2) 擬結晶 3) 胞囊狀 (X 體)	1) 病毒結晶及聚集：a) 俯視為六角形，側視時為四角形 b) 俯視為圓盤形 c) 絲狀聚集物 其他 2) 擬結晶 3) 胞囊狀 (X 體)	1) 分解 2) (抗) 3) 抗	1) 綠色 2) 綠色 3) 橙綠色	1) 不加熱時無色，加熱後為紫紅色 2) 同 1) 3) 紫紅色	1) 加熱後內含體為紫紅色為此群病毒之診斷特色。 2) 擬結晶病毒聚集物常出現於後期感染。 3) X 體常出現於感染之初期。
Tospo-	細胞質 1) 濃密之不規則內含體並有指狀突出物	1) 濃密之不規則內含體並有指狀突	1) (抗) 2) 抗	1) 綠色 2) 綠色	1) 紫紅色 2) 無色	1) <u>指狀突出物為病毒與分散型高爾基</u>

	其他 2)不規則蛋白質體	出物 其他				<u>體和內質網之混合物。</u> 2) 只有一些感染可觀察到。
Tombus-	細胞質 1)病毒結晶及聚集 2)多液泡狀體 細胞核 3)球形	細胞質 1)病毒結晶及聚集 2)多液泡狀體 細胞核 3)球形	1)(抗) 2)分解 3)抗	1)綠色 2)綠色 3)綠色	1)紫紅色 2)微紅色 3)紫紅色	1) <u>球形聚集物常出現於細胞質與中央液泡，若同時觀察到多液泡狀體，可斷定為此群病毒。</u> 2) 多液泡狀體是圍小體、粒線體與葉綠體之衍生物。
Tymo-	細胞質 1)變形之葉綠體叢聚與細胞質中深染色物質 其他 2)病毒結晶及聚集 細胞核 3)擴散性核內含體(蛋白質)	1) 變形之葉綠體叢聚與細胞質中深染色物質	1)(抗) 2)(抗) 3)抗	1)綠色 2)綠色 3)綠色	1)紫紅色 2)紫紅色 3)無色	1) <u>一般質體可被 Triton X-100 分解，而此病毒群所特有之變形之葉綠體叢聚非常穩定。</u> 2) 病毒結晶內含體存在於細胞質與中央空泡中。 3) 擴散性核內含體為蛋白質所聚成。

乙) 病毒內含體大量分佈在維管束之病毒屬

病毒屬 -virus	內含體	供診斷用內 含體	Triton X-100	橙綠蛋白 質染劑	紫紅核酸 染劑	附註
Clostero-	細胞質 1)擬結晶狀， 帶狀 2)韌皮細胞有 濃密染色物質 與胞囊	細胞質 1)擬結晶 狀，帶狀 2)韌皮細胞 有濃密染色 物質與胞囊	1)分解 2)抗	1)綠色 2)綠色	1)紫紅色 2)紫紅色	因為此病毒群之 形狀與存在位置 可供作為 Closterovirus 之 診斷依據
Gemini-	細胞核 1)圓而濃密之 核內含體(可 多個存在) 其他 2)環狀	1)圓而濃密 之核內含體 (可多個存 在)	1)抗	2) 綠色 2)綠色	1)藍色 2)藍/綠色	<u>韌皮部薄壁細胞</u> <u>胞之細胞核內含</u> <u>染成藍色之</u> <u>DNA 病毒內含</u> <u>體</u>
Luteo-	細胞質 1)病毒結晶及 聚集		1)(抗)	1)綠色	1)紫紅色	感染後期有韌皮 部壞疽現象，此 與不規則形內含 體之發生有關
Reo-	細胞質 1)病毒結晶及 聚集 2)圓形或長形		1)(抗) 2)抗	1)綠色 2)綠色	1)紫紅色 2)紫紅色	1)內含體可為多 角形和不規則形 2)韌皮部存有長 形 (Phyto-reovirus) 與球形(Fijivirus) 的病毒質，並且 在韌皮部觀察到 病毒結晶及聚集 物，可供此病毒 群之診斷參考

引用文獻

- 王惠亮、王熾婷、廖麗貞。2000。核酸探針雜合反應或反轉錄聚合酶連鎖反應偵測喜姆比蘭嵌紋病毒之比較。植物保護學會會刊 42：25-42。
- 胡仲祺、張世忠、陳信宏。2004。植物病毒快速檢測試劑套組簡介。植物病毒診斷鑑定技術之發展與應用研討會論文集。pp65-73。
- 柯南靖。1982。台灣 *Odontoglossum* 輪斑病毒之發生與鑑定。中華蘭藝 5：319-331。
- 張清安。2005。植物保護技術專刊系列 1-蘭花病毒病。行政院農委會動植物防疫檢疫局出版。P62。
- 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。
- 楊佐琦。1998。植物病毒病害之光學鏡檢診斷技術。臺灣農業 34(4):57-63。
- 楊佐琦。2000。百合栽培應注意的病毒病害。台灣花卉園藝 150:30-35。
- 楊佐琦。2004。海芋病毒病害及防治。台灣花卉園藝 198:38-44。
- 楊佐琦、莊佳茹、蕭芳蘭、孫永偉、陳駿季、蕭吉雄。2004。蕙蘭嵌紋病毒(CymMV)與齒舌蘭輪斑病毒(ORSV)快速檢定技術。植物種苗 6 (4)：7-30。
- 楊佐琦、莊佳茹、王慧如、蕭芳蘭、邱燕欣、吳倩芳、蕭吉雄。2006。二種重要蘭花病毒之快速檢定技術與蘭花產業之應用。2006 台灣國際蘭花研討會專輯：200-221。
- Christie, R. G. and Edwardson, J. R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. 9. 155 pp.
- Elliott, M. S., Zettler, F.W., Zimmerman, M.T., Jr. Barnett, O.W., and LeGrande, M. D.1996. Problems with interpretation of serological assays in a virus survey of orchid species from Puerto Rico, Ecuador, and Florida. Plant Dis. 80:1160-1164.
- Langeveld, S. A., Dore, J. D., Memelink, J., Derks, A. F. L.M., van der Vulgt, C. I. M., Asjes, C. J., and Bol, J. F. 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. J. Gen. Virol. 72:1531-1541.
- Lawson, R. H. and Hearon, S. S. 1973. Symptomatology of cattleya mericlones infected with cymbidium mosaic virus. Amer. Orchid Soc. Bull. 42:1071-1074.
- Seoh, M.-L., Wong, S.-K., and Zhang, L. 1998. Simultaneous TD/RT-PCR detection of cymbidium mosaic potexvirus and odontoglossum ringspot tobamovirus with a single pair of primers. J. Virol. Methods 72:197-204.
- Yang, T. -C. 1997. Cytological characteristics and detection of viruses of *Lilium* spp. Ph. D. Dissertation. University of Florida, Gainesville. 168pp.
- Zettler, F. W., Ko, N.-J., Wisler, G. C., Elliot, M. S., and Wong, S.-K.. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Dis. 74:621-626.