齒舌蘭輪斑病毒（*Odontoglossum ringspot virus*）在四季蘭植株上之分佈差異與病毒檢測應用

陳金枝*　林家佑　鄭櫻慧　江芬蘭

1.台中縣霧峰鄉　行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

（接受日期：2010 年 11 月 22 日）

摘　要

陳金枝*、林家佑、鄭櫻慧、江芬蘭　2010　齒舌蘭輪斑病毒（*Odontoglossum ringspot virus*）在四季蘭植株上之分佈差異與病毒檢測應用　植保會刊　52(1): 17-24

四季蘭乃屬於蕙蘭屬（*Cymbidium* spp.）蘭花，一般所稱的小花蕙蘭，包括報歲蘭、四季蘭、素心蘭、春蘭以及寒蘭等。近年來國內大規模的經濟栽培，以及出口外銷所得之經濟效益，使得小花蕙蘭躍居爲相當重要的經濟花卉。病毒病的發生影響蘭花的生產品質與經濟價值，傳統上蕙蘭以無性分株法爲主要繁殖方法[4]，因此，母株若感染病毒，其後代所有子芽都會受到感染而逐漸衰弱[1, 2]。

目前國際上記錄可感染蘭花病毒種類已超過 50 種[2, 10, 17, 18, 19]，已被報導可感染蕙蘭屬蘭花的病毒種類[1, 2]，包括康乃馨斑駁病毒（*Carnation mottle virus*，CarMV）、蕙蘭（東亞蘭）嵌紋病毒（*Cymbidium mosaic virus*，CymMV）、東亞蘭黃化嵌紋病毒（Cymbidium chlorotic mosaic virus，CymCMV）、東亞蘭微嵌紋病毒（Cymbidium mild mosaic virus，CymMMV）、東亞蘭輪點病毒（*Cymbidium ringspot virus*，CyRSV）、齒舌蘭輪斑病毒（*Odontoglossum ringspot virus*，ORSV）、蘭花斑點病毒（Orchid fleck virus，OFV）、煙草嵌紋病毒蘭花分離株（*Tobacco mosaic virus* orchid strain，TMV-orchid）、蕃茄輪點病毒（*Tomato ringspot virus*，TomRSV）、蕪菁嵌紋病毒（*Turnip mosaic virus*，TuMV）等 10 種。其中，CymMV 與 ORSV 是目前蘭花上普遍發生，可感染蘭花種類最多的病毒，對蘭花產業經濟面影響最深重者[2, 13, 17]，目前也是國內在文心蘭與蝴蝶蘭健康種苗驗證

* 通訊作者。E-mail: chinzue@tari.gov.tw

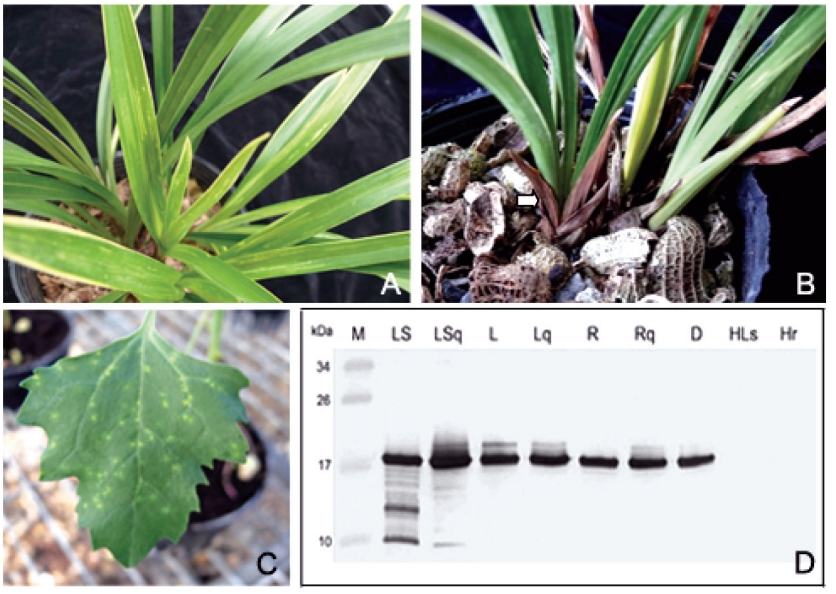
制度規範中必須檢定的病毒種類。

國內的國蘭病毒病害，目前已發現有記錄的病毒，顯示仍以CymMV及ORSV爲主[2]。受CymMV感染之蕙蘭植株，常見葉片出現黑色壞疽斑點或壞疽條紋等病徵，壞疽斑有時只出現於葉片下表面；部份蕙蘭會產生黃綠斑駁之嵌紋（mosaic）或黃化條斑型（chlorotic streak）病徵[1,2]。ORSV乃煙草嵌紋病毒屬（*Tobamovirus*）之成員，顆粒體呈短桿狀，長度約 300 nm[11]，此病毒最早於 1951 年在美國的 *Odontoglossum grande* 上被發現，引起植株葉片之輪斑（ringspot）病徵[9]，其感染蘭科植物造成之病徵尚包括有嵌紋、斑紋（mottle）、黃化條紋、壞疽型（necrosis）[2, 17]、或是花瓣皺化（flower crinkle）[19]。ORSV 若與 CymMV 複合感染同一植株，常會造成病徵加重現象[2]。而蕙蘭植株發生ORSV感染，多數品系在新分芽的幼葉上可見明顯之嵌紋或條斑病徵，也有發生褐色輪斑者，不同之蕙蘭種類產生之病徵會有差異，有些品系並不會形成病徵。

透過早期檢測病毒的發生狀況，確保無病毒健康種苗的栽培，爲預防病毒發生之重要措施之一。檢測的準確度除了受到採用的方法敏感度不同而影響外，正確的取樣方式乃影響檢測結果之重要因素[5, 6]。理論上病毒應造成系統性感染，但近十年多來本研究室針對病毒在夜來香[5]、百合[3]、唐菖蒲[6]等花卉作物上對於病毒分佈之檢測結果，顯示植株不同部位組織內之病毒濃度並不相同。以百合爲例，CMV 百合在植株上之分佈相當不均勻，檢測時必須採取莖部之表皮組織才能獲得較高之檢出率[3]；以唐菖蒲爲例，根據 Stein 等人之報告，BYMV 及CMV均可由感染植株之葉片中被檢測出來，但CMV由球根組織中被檢出之機率高於葉片[14,15]；本研究室過去之研究也發現感染CMV之唐菖蒲有累積病毒於下位葉組織之傾向[6]，此現象會導致若依一般慣例採取新葉組織作爲檢定材料時，會獲得與事實相左之結果，因此配合正確的取樣部位作檢測才能獲致更準確的結果。筆者初步針對鐵骨樹心、春蘭、瑞華、山川等小花蕙蘭品系之不同分芽上之葉片，以 ELISA 法進行 ORSV 病毒檢測結果顯示，病毒確實爲不均勻分佈之狀況，單獨採取某一分株上的葉片作檢測，並未能反應當棵植株的病毒感染狀況（結果未出示），因此本研究針對受ORSV感染之四季蘭（玉花），檢測植株不同部位的ORSV濃度與檢出率，以探討此病毒在此蘭花植株上之分佈，尋求更準確的取樣檢測依據，以提升病毒的檢測準確度。

本研究選用確知感染有ORSV而植株新葉呈現嵌紋病徵之四季蘭（玉花）母本（圖一，A）經由分芽繁殖後之植株十盆，每盆各含有 5-12 株分芽，分別就每盆不同分芽的葉片、根及近基部已老化呈現乾褐色之葉鞘（圖一，B）等爲檢測對象，進行ORSV於植株全株分佈之檢測。試驗中葉片之檢測乃將每盆植株所有的分芽，依照分芽數，每一分芽取每片葉子的上位葉及中段部位作採樣檢測（圖一，A）；根部的檢測，每一分芽採取兩條根系之根尖組織爲樣品；葉鞘的檢測，

每一分芽的基部附近取老化的褐色葉鞘，將上述之樣品分別取 0.1 克組織，以 3 ml 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 （sodium carbonate buffer，pH 9.6）加以研磨，所得粗汁液直接添加於 96 孔 EIA 反應盤內 （100 μl ／孔），再以稀釋 1000 倍之 ORSV 免疫球蛋白（IgG）進行 Indirect ELISA 檢測，ELISA 所採用之流程已於過去之報告中詳述[7]，於添加鹼性磷酸酶基質後 30 分鐘之反應結果以 ELISA 讀值儀（E-Max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA）讀取波長 405 nm 下之吸收值，作爲評估病毒濃度高低之依據，本研究以健康玉花植株葉片爲負對照，樣品的ELISA讀值高於健康負對照讀值兩倍者視爲檢出有病毒之正反應。以葉片、葉鞘及根部不同部位所獲得檢出爲正反應之樣品數，作爲評估病毒檢出率之依據。



圖一、玉花植株葉鞘組織及檢測出有 ORSV 之病組織接種於奎藜後出現之局部斑點病徵以及西方轉漬分析證實 ORSV 病毒之存在。

Fig 1. Symptoms caused by *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) infection on *Cymbidium* spp. and *Chenopodium quinoa* plants and virus detection by western blotting using the immunoglobulin G (IgG) to ORSV. (A) Mosaic symptoms observed on leaves of the ORSV-infected *Cymbidium* plant. (B) The leaf sheath portions (indicated by an arrow) of the ORSV-infected *Cymbidium* plants were used for virus detection. (C) Local lesions developed on a leaf of *C. quinoa* inoculated with crude extract of an ORSV-positive *Cymbidium* leaf sheath tissue. (D) Western blotting was performed for detecting ORSV in the different portions of a *Cymbidium* plant. Lane M, protein marker; lane LS, leaf sheath; lane L, leaf tissue; lane R, root tissues; lanes LSq, Lq and Rq, local lesions caused by introducing the ORSV-infected tissues of leaf sheath, leaf, and root to *C. quinoa*, respectively; lane D, ORSV diseased control; lane HLs, healthy leaf sheath; lane Hr, healthy root.

取部分經由ELISA檢測結果爲正反應之樣品作西方轉漬法，以確定所得之正反應確屬預估之病毒分子量之反應結果，並以機械接種法將病組織汁液接種於奎藜（*Chenopodium quinoa* Willd）葉片，以確認病毒之感染力。

結果顯示（表一），在所取樣的十盆玉花四季蘭中，不同部位之病毒濃度平均約爲 2.08-2.72（結果未出示）；而病毒之檢出率，以葉鞘而言其病毒檢出率爲 86-100 %，平均檢出率爲 97.4 %，取樣植株中有 80 %的葉鞘之病毒檢出率達 100 %；其次爲根組織部位，每盆根檢出病毒的比率爲 63.0-100 %之間，平均檢出率爲 85.3 %，高於 85 %檢出率的植株數比率爲 70 %；由葉部檢出病毒的比率最低，每盆葉片檢出病毒比率於葉尖附近處爲 34.2-100 %之間，平均檢出率爲 71.0 %，而由葉中段部位檢出率爲 34.2-100 %之間，其平均檢出率爲 75.9 %。本試驗結果顯示ORSV在玉花植株上之分佈呈現不均勻狀態，病毒檢出率之取樣部位以老化乾燥的葉鞘最高，顯著地高於根系及葉部之檢出率（表一）。葉部由於不同分芽，不同葉位的差異性，病毒的分佈因而相對不均勻。而進一步將根系、老化

表一、由四季蘭植株不同部位組織檢測齒舌蘭輪斑病毒（*Odontoglossum ringspot virus*）之檢出率

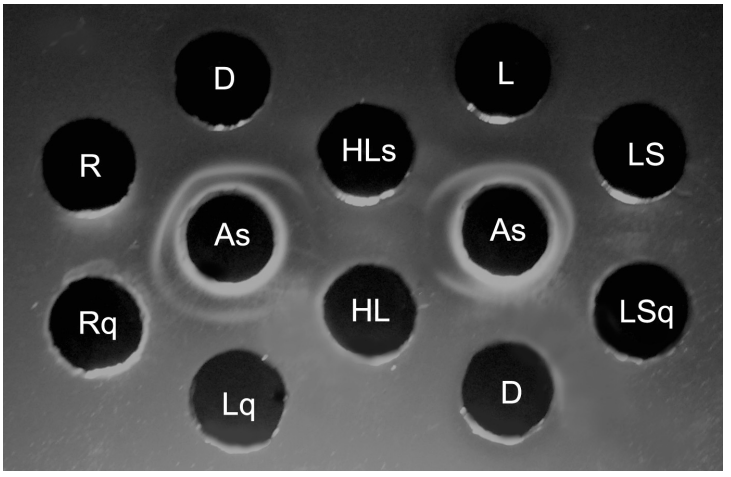
Table 1.Detection rates of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) on different portions of *Cymbidium* plants

		% of detection[1]			
Pot	No. of shoots	Leaf upper site	Leaf middle site	Leaf sheath	Root
1	10	34.2	34.2	100.0	90.0
2	12	50.0	47.9	100.0	87.5
3	8	66.7	84.6	100.0	87.5
4	5	59.3	62.9	100.0	90.0
5	6	68.0	56.0	100.0	100.0
6	6	70.0	93.3	86.0	92.9
7	7	82.9	97.1	87.5	63.0
8	5	100.0	95.2	100.0	80.0
9	7	100.0	100.0	100.0	92.8
10	8	79.4	88.2	100.0	68.8
Average		71.0 b[2]	75.9 b	97.4 a	85.3 ab

[1] % of detection = (No. of samples with positive reaction divided by the total no. sampled from each portion) x 100 %.

[2] Average values of the virus detection rates of different plant portions with the same letter are not different significantly according to Duncan's new multiple range test while p=0.05, by using JMP 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

葉鞘及葉部檢測出有ORSV的病組織進行奎藜接種，結果顯示接種後4天左右即可觀察到單斑之形成（圖一，C），以西方轉漬法（圖一，D）確認其爲ORSV病毒之鞘蛋白分子反應；並以ORSV抗血清進行SDS-免疫擴散反應[12]發現來自於罹病玉花組織包括葉片、根系、及葉鞘，以及此等病組織接種於奎藜葉片所形成之單斑組織，均與ORSV抗血清產生免疫沈澱反應，且與ORSV對照抗原確有同源反應（identical reaction）（圖二），此結果證實由玉花四季蘭不同部位組織以ELISA檢測出有ORSV反應者，確實爲ORSV感染所造成；更證實殘存於老化葉鞘組織之ORSV具有傳染ORSV之風險，而且採樣此葉鞘部位，對於病毒之檢測可提供更準確的檢測結果。



圖二、SDS-免疫擴散法檢測具有齒舌蘭輪斑病毒（ORSV）抗原性反應之玉花四季蘭不同部位組織及此等病組織接種於奎藜上所產生之局部病斑。中央小穴乃添加ORSV抗血清（As）；周圍六穴乃分別加入經SDS處理後之樣品包括ORSV標準抗原（D）、葉片組織（L）、老化葉鞘組織（LS）、根部組織（R）、接種於奎藜產生局部病斑之組織包括葉片（Lq）、老化葉鞘組織（LSq）及根部組織（Rq）；及健康四季蘭對照抗原包括葉片（HL）及葉鞘（HLs）。

Fig 2. SDS-immunodiffusion test of antigens from different portions of ORSV-infected *Cymbidium* plants reacted with the antiserum against *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV). The central well was filled with antiserum against ORSV (As). The peripheral wells were filled with SDS-treated antigens including the standard ORSV antigen (D), the leaves (L), old leave sheath (LS) and roots (R) of *Cymbidium* plants, and local lesions on *C. quinoa* caused by the infection of ORSV existed in diseased tissues of leaves (Lq), old leave sheath (LSq) and roots (Rq), respectively. The healthy *Cymbidium* leaf (HL) and leaf sheath (HLs) were used as negative controls.

此種在植株上分布不均勻之狀態，在以往之研究報告中均有呈現[3,5,6]，不同病毒種類有不同之分佈特性，有些病毒甚至只累積於某些特定部位，而其他部位則濃度偏低，因此進行病毒檢查時必須正確取樣，才能獲得正確之檢定結果。因此ORSV在玉花四季蘭植株分佈的特性而言，單獨採取葉部進行病毒檢測，反而會導致檢出率的誤差（表一）。

ORSV 的病毒特性相當穩定，耐熱性強達 95℃的溫度，根據日籍學者 Inouye 之報告，ORSV 在 20℃下，於寄主細胞外可存活至少 10 年之久[8]，爲穩定性極高的植物病毒。此病毒主要透過機械性傷口方式傳播[17]，整個生產過程中可能造成植株傷口的操作，包括植株之間的碰觸或摩擦、切花、被病毒污染的手、器具或栽培盆缽等都可能傳播病毒，母本帶病毒透過組織培養更會大量傳播此病毒的發生[1,2]。蕙蘭以分芽方式繁殖，容易隨母芽帶毒而傳染，以本研究之結果顯示單獨採取新鮮葉片進行病毒檢測，容易因植株分芽數多以及病毒分佈不均導致檢測之誤差，透過葉鞘或根系的取樣對於小花蕙蘭的ORSV病毒檢測可以提供更準確的檢出率，減低母本帶毒傳播之機率。

本研究室初步由達摩以及春蘭等零星的樣品檢測ORSV病毒結果顯示，於老化葉鞘部位之病毒檢出率以及取病組織進行奎藜單斑接種試驗結果，均與玉花四季蘭有類似的趨向（未出示結果），因此單一品系的樣品是否同樣地反應出不同種小花蕙蘭之ORSV病毒分佈情形，仍有待更多品系的檢測結果印證，以提供蕙蘭ORSV病毒檢測之標準模式，尤其對於某些品系感染病毒後並未出現明顯病徵者，能有更精確的取樣方式，可以提升病毒的檢測率，建立更準確病毒檢測標準。

（關鍵詞：四季蘭、齒舌蘭輪斑病毒、病毒累積、葉鞘）

引用文獻

1. 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。
2. 張清安。2005。植物保護技術專刊系列 1-蘭花病毒病。62 pp。張清安編著。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出版。
3. 張清安、陳金枝、鄧汀欽、蔡惠婷。1996。百合斑紋、百合隱徵型及胡瓜嵌紋等三種病毒於百合植株上分佈之差異及三者對不同病徵型表現之影響。植保會刊 38：372。
4. 賴本智、楊秀蘭、陳任芳、張清安、位國慶。1994。蘭花經濟栽培技術 pp178。行政院青年輔導委員會出版。
5. 陳金枝、江芬蘭、張清安。1998。夜來香微嵌紋病毒在植株內之分布及其對病毒檢測之影響。植保會刊 40：199-207。
6. 陳金枝、張清安、戴廷恩。1999。菜豆黃化嵌紋病毒及胡瓜嵌紋病毒在唐菖蒲葉片之分佈及其對病毒檢測之影響。植

病會刊 8：117-120。

7. 陳金枝、鄭櫻慧、黃春惠、江芬蘭、陳麗雯、張清安。2009。利用細菌表現康乃馨斑駁病毒之鞘蛋白製備多元抗體及其檢測應用。植病會刊 18：35-44。
8. Inouye, N. 1983. Host range and properties of a strain of odontoglossum ringspot virus in Japan. Nogaku Kenkyu 60: 53-67.
9. Jensen, D. D., and Gold, H. A. 1951. A virus ringspot of odontoglossum orchid symptoms, transmission and electron microscopy. Phytopathology 41: 618-653.
10. Lawson, R. H., and Brannigan, M. 1986. Virus disease of orchids. Handbook of orchid pests and diseases. pp. 2-49. Florida: American Orchid Society.
11. Paul, H. L. 1975. Odontoglossum ringspot virus. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 155.
12. Purcifull, D. E., and Batchelor , D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. Fla. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 788. 39 pp.
13. Siegmann, B. J., Elliott, M. S., and Zettler, F. 1998. Relative incidences of CymMV, ORSV and CymRSV in commercial, private and public orchid collections. Proc. Fla. State Hort. Soc. 111: 41-43.
14. Stein, A., Levy, S., and Loebenstein, G. 1988. Detection of virus in gladioli corms. Acta. Horti. 234: 275-280.
15. Stein, A., Loebenstein, G., and Koenig, R. 1979. Detection of cucumber mosaic virus and bean yellow mosaic virus in gladioli by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plant Dis. Reptr. 63: 185-188.
16. Wong, S. M., Chang, C. G. , Lee, H. Y., Tan, K., and Zettler, F. W. 1994. Incidence of Cymbidium mosaic and Odontoglossum ringspot viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. Crop Protection 13: 235-239.
17. Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliot, M. S., and Wond, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Dis. 74: 621-626.
18. Zheng, Y. X., Chen, C. C., Yang, C. J., Yeh, S. D., and Jan, F. J. 2008. Identification and characterization of a tospocirus causing chlorotic ringspots on *Phalaenopsis* orchids. Eur. J. Plant Pathol. 120: 199-209.
19. Zheng, Y. X., Shen, B. N., Chen, C. C., and Jan, F. J. 2010. *Odontoglossum ringspot virus* causing flower crinkle in *Phalaenopsis* hybrids. Eur. J. Plant Pathol. 128: 1-5.

ABSTRACT

Chen, C. C., Lin , J. Y., Cheng, Y. H. and Chiang, F. L. 2010. Distribution of *Odontoglossum ringspot virus* on plant of *Cymbidium* spp. and its application on virus detection. Plant Prot. Bull. 52(1): 17-24（Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung）

Cymbidium spp. are popular ornamental crops with economical importance in Taiwan. *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) are two major viruses infecting orchids worldwide. *Cymbidium* plants are mostly propagated by transplanting the lateral shoots. Therefore, the virus-indexing work of mother plants before planting is very important to make sure virus-free of shoots for virus control in *Cymbidium* spp. The concentrations of ORSV accumulated in tissues of different leaf orders, roots, and leaf sheaths of *Cymbidium* spp. cultivar Yu-Wha plants were compared in this study. Ten pots of ORSV-infected *Cymbidium* plants were selected for the virus detection. Our results showed that ORSV is unevenly distributed in whole plant. The detection rates of ORSV existing in the different portions of plants were vary that 97.4% for the old leaf sheaths, 85.3% for roots, 71% for the upper portion of leaves and 75.9% for the middle portion of leaves, respectively. Local lesions were developed at 4 days after mechanically introduced those virus-positive samples including the old leaf sheaths, roots and leaves to leaves of *Chenopodium quinoa*. Further serological analyses of western blotting and SDS-immunodiffusion indicated that all of the local lesions were induced by ORSV infection. The biological and serological characterizations of ORSV in the old leaf sheaths revealed that ORSV is survival in this site and with high risk to be a virus inoculum source. Our results also revealed that the leaf sheath would be a better sampling site for increasing the virus detection rate to improve the efficiency of virus indexing on plants of *Cymbidium* spp.

(Key words: *Cymbidium* spp., *Odontoglossum ringspot virus*, virus accumulation, leaf sheath)

*Corresponding author. E-mail: chinzue@tari.gov.tw