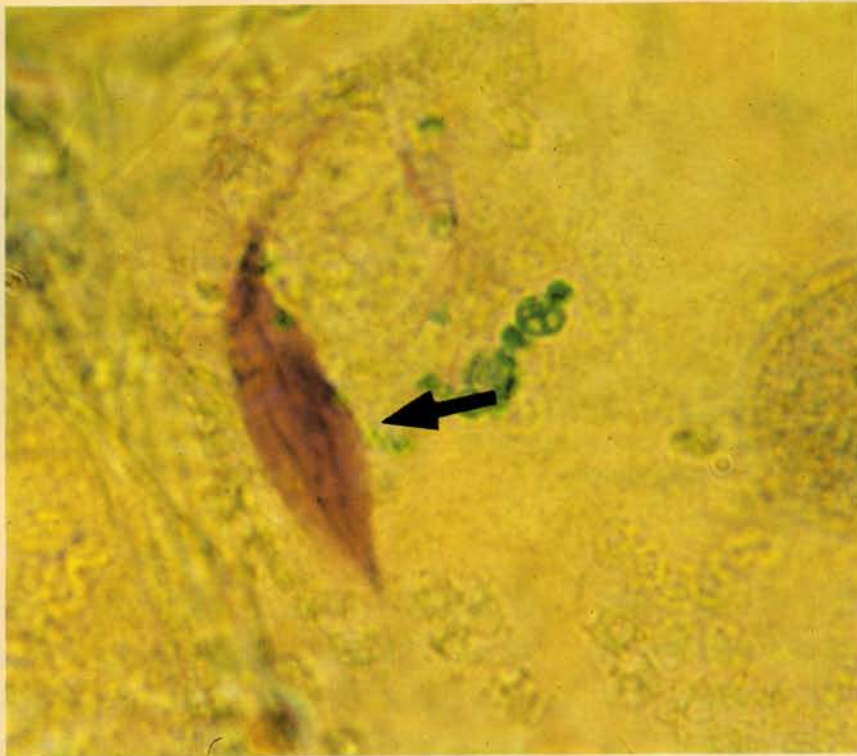
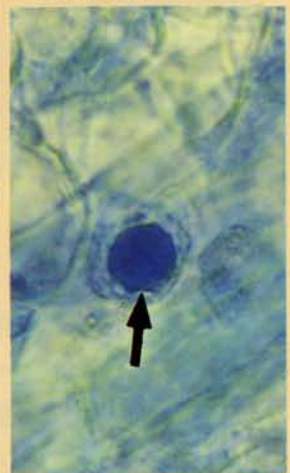


簡易 植物病毒診斷技術



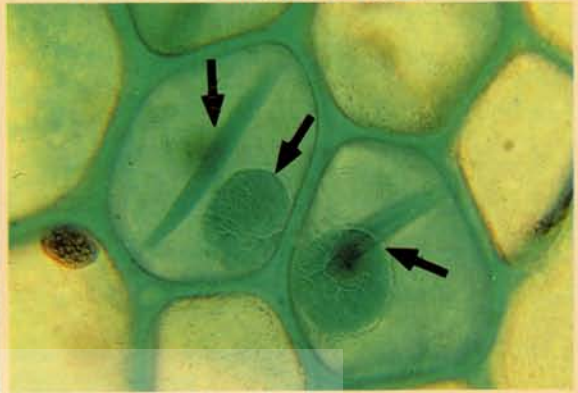
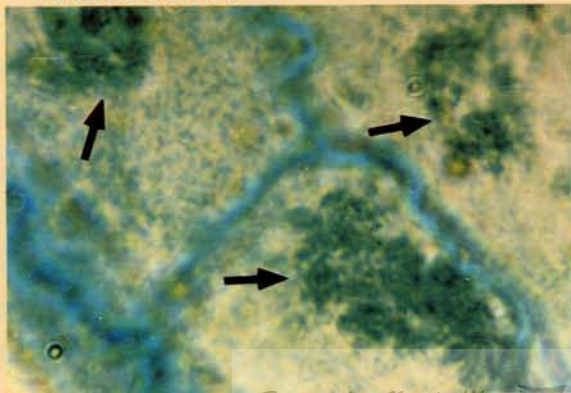
◀圖一、經紫紅核酸染劑染色之核糖核酸病毒內含體呈紫紅色（箭頭所示），右邊為細胞核。

▼圖二經紫紅核酸染劑染色之去氧核糖核酸病毒內含體呈藍色（箭頭所示）。



▼圖三細胞質內含體經橙綠染劑染色後呈暗綠色（箭頭所示）。

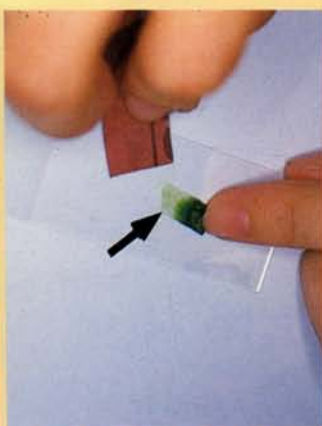
▼圖四病毒顆粒聚集而成的內含體（箭頭所示）經橙綠染劑染色後呈綠色。



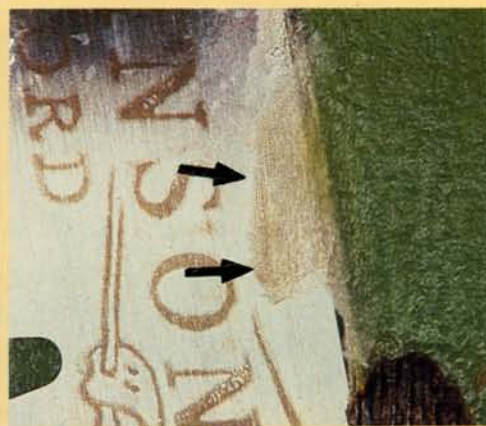
►圖五、內含體染色技術所需之器材及藥品。



▲圖六、染色組織之取得——皮撕裂法。



▲圖七、染色組織之取得——砂紙摩擦法。



▲圖八、染色組織之取得——直接切取表皮組織法。

光學顯微鏡利用在植物病害之診斷，通常只限於真菌、細菌、線蟲等病原之診斷，很少人會想到利用它當作病毒之診斷，最主要原因乃是病毒之顆粒遠小於光學顯微鏡之解像功能與病毒內含體 (inclusions) 之資料尚未完整，以致大家一直無法利用光學顯微鏡來診斷植物病毒。事實上，很多植物病毒皆可形成特殊的內含體，尤其是不同的病毒群 (植物病毒分類的單位) 所形成的內含體皆不同，藉著染色方法將內含體染色後，可以利用光學顯微鏡來觀察病毒內含體，藉此，可以將植物病毒診斷至

其屬於那一群的病毒，有些甚至可以診斷至病毒的種類，例如，煙草嵌紋病毒、胡瓜嵌紋病毒等。這種利用光學顯微鏡來觀察病毒內含體，進而判斷何種病毒之方法，也就是本文所謂的簡易植物病毒診斷技術。

病毒內含體乃是病毒感染後在細胞內所形成的一種構造，它可能是病毒顆粒之聚合體，病毒基因的產物，病毒侵入細胞後所造成的異常細胞成份或是以上任何二者或以上的混合體，內含體的染色特性及構造皆與其周圍之細胞質及胞器不同，依其組成份而言，主要可分

為核酸及蛋白質兩種，含有核醣核酸（RNA）的內含體經紫紅核酸染劑（Azure A）染色後，可以呈現紫紅色（圖一），如果內含體含有去氧核醣核酸（DNA）時，則被染成藍色（圖二）。含有蛋白質的內含體經紫紅核酸染劑染色時不呈色，然而，利用另外一種染劑—橙綠蛋白質染劑（Calcomine orange -Luxol brilliant green）染色時，則可染成近乎暗綠的顏色（圖三），有些則染成綠色（圖四）。

在美國的佛羅里達大學的植物病毒學家對此光學顯微鏡診斷植物病毒之技術已研究二十多年，其實用性及可靠性已被肯定，此方法除了具有簡易及廉價之優點外，並且可以診斷一些其他診斷方法所不易診斷之病毒，例如雙生病毒群（圖二）或桿形病毒群等，此方法所需儀器最主要者乃是一台配備有油浸鏡頭之光學顯微鏡，與他器材（圖五）包括5號鑷子；載玻片、蓋玻片、染色皿、竹棒、試藥瓶等，藥品則包括紫紅核酸染劑、橙色染劑（Calcomine orange）、綠色染劑（Luxol brilliant green）、酒精、磷酸氫二鈉、封埋劑、2—甲氧基乙醇、2—甲氧基、乙基醋酸及出來通展著劑X—100等。

欲有效利用光學顯微鏡診斷技術，首先必須瞭解植物細胞之構造，因為細胞是生命之基本單位，每個細胞乃是透明且為半流體之細胞質包含著各種胞器所形成，細胞內最大的胞器應屬於球形的細胞核，核內含有一球形的核仁，核質與核仁分別含有大量之去氧核醣核酸及核醣核酸，利用紫紅核酸染劑染色時，前者可被染成藍色，後者則被染成紫紅色。

一般而言，由於表皮組織含有很多

病毒內含體，被染色之植物組織取得，一般皆以鑷子撕取下表皮後，直接將被撕裂的表皮組織面與剛配製好的染色液接觸即可（圖六）。在診斷時，首先須取得健全之植物組織作深刻的瞭解其構造後，再開始研究感染病毒之組織，這樣可使初學者瞭解到健全與感染組織經染色後有那些區別，而找出細胞內的病毒內含體，從而判斷植物病毒的群或種類。

植物組織之取得除了利用鑷子撕取下表皮外，對一般之草本植物而言，似乎很少有困難性，但是，像禾本科之植物葉片在取表皮時通常有很大的困難，為了克服這難題，筆者創作砂紙摩擦法（圖七）來取得很薄的植物組織供染色用，所用的砂紙必須在400目以上的才適用，國產的砂紙品質極差，一般很難達到預期的效果，最好是採用美國製的砂紙，日本製的砂紙亦可。此種砂紙摩擦法除了禾本科植物外，其他很難取得表皮組織之作物葉片，例如木瓜，亦可利用此法取得極薄之組織供染色用，筆者在佛羅里達大學進修時，曾以此方法診斷木瓜的一些病毒，包括木瓜輪點病毒及桿形病毒等。至於葉片較厚無法取得表皮組織之作物，例如嘉德利亞蘭，則以一半的雙面刀片與表皮平行切下極薄的組織供染色用（圖八），徒手切片法所得之切片亦是很適合染色用的組織，特別是檢查位於韌皮部的內含體。另外，利用冷凍切片機所得之切片亦是很好的染色材料，此冷凍切片法很適用於生長點、子房、莖及根部之研究。

上述之表皮組織或極薄之組織取得後，則馬上將其置於剛配製好的染色液上，前面提到的紫紅核酸染色法是先將九份之0.1%紫紅核酸染劑溶液（溶於

2-甲氧基乙醇)加入一份之0.2 M磷酸氫二鈉溶液混合均勻後,再將取得之組織撕裂面(或切割面)與染液接觸,染色10至15分鐘後,以吸管吸掉染液,並以酒精處理以除去組織上多餘之染液,最後再以2-甲氧基乙基醋酸處理十分鐘,然後以封埋劑封埋,就可以光學顯微鏡鏡檢。經紫紅核酸染劑染色後,除了含有核醣核酸之構造(即所謂的病毒內含體)可被染成與核仁相同之紫紅色外,如果是屬於去氧核醣核酸病毒所引起之內含體則被染成藍色,其他各構造之呈色反應分別為:細胞核內染色質一藍色,核質一無色,色素體一無色或淡粉紅色,晶體一無色,細胞質一無色。另外一種橙綠蛋白質染色法是一份蒸餾水,一份1%橙色染劑及八份1%綠色染劑(此二種染劑之溶劑亦是2-甲氧基乙醇),配製好後,再將欲染色之組織如前面所述之方法取得後,置於染液,染色10至15分鐘後,則同樣以吸管吸掉染液,並快速地加入酒精洗去組織上多餘的染液,即刻將酒精吸掉,並加入2-甲氧基乙基醋酸處理10分鐘,最後以封埋劑封埋並以光學顯微鏡鏡檢。為了鏡檢時觀察方便起見,一般可在染色前以5%出來通展著劑X-100溶液處理5分鐘,可以除去色素體,但是須特別注意,有些內含體會遭受其破壞,因此使用出來通展著劑處理時必須有對照處理,以瞭解內含體是否會遭受其破壞,經過橙綠蛋白質染劑染色後,細胞內之各構造之呈色反應分別為:細胞核一橙色,核仁一暗綠色,色素體一黃色,晶體一綠色,細胞質一淺黃色。

病毒內含體之分佈並不一定都在表皮組織內,有些病毒內含體只能在韌皮組織內才能發現,例如柑桔 *tristeza*

病毒只在韌皮組織。因此,在利用此方法診斷植物病毒時,除了表皮組織外,維管組織還須包括在內,才不致造成誤診之情形。

根據1982年國際病毒分類委員會命名之28個植物病毒群中,已記載之植物病毒種類已有484種之多,到目前為止,可以利用光學顯微鏡作診斷之病毒群已有十一群之多,這十一群包括康乃馨潛伏病毒群,花椰菜嵌紋病毒群,線形病毒群,豇豆嵌紋病毒群,胡瓜嵌紋病毒群,雙生病毒群、馬鈴薯X病毒群、馬鈴薯Y病毒群、雙鏈核醣核酸病毒群、桿形病毒群及煙草嵌紋病毒群。其他各群有關此方面之資料亦在增加中,所有屬於這十一群病毒之數目占了所有植物病毒種類之70%以上,這些植物病毒群所包括之種類有不少是國內尚未記載者。因此,如能善用此方法作診斷,再配合其他有關之病毒研究方法,要在國內建立完整的植物病毒資料應不是一件很困難的事。

前面所述,每個染色方法所需時間皆在30分鐘之內,如果取樣適當,則可在極短時間內診斷出感染病毒之群或種類。當染色技術熟習後,病毒之診斷則需多花一些時間去判斷病毒之歸屬。這與其他之研究方法一樣,剛開始時總是很不習慣,當然熟能生巧,到時候你就可以利用簡單的設備來診斷一般情形下所看不到的植物病毒了。

期望此篇內容能給予一般推廣人員(尤其是病蟲害防治人員)或非植物病理人員對病毒病害之診斷有進一步的認識,如果能藉此方法而作正確的病毒診斷,則可以依此結果提出一個很適當的防治對策,而將病毒所造成的損失減至最低程度。 □