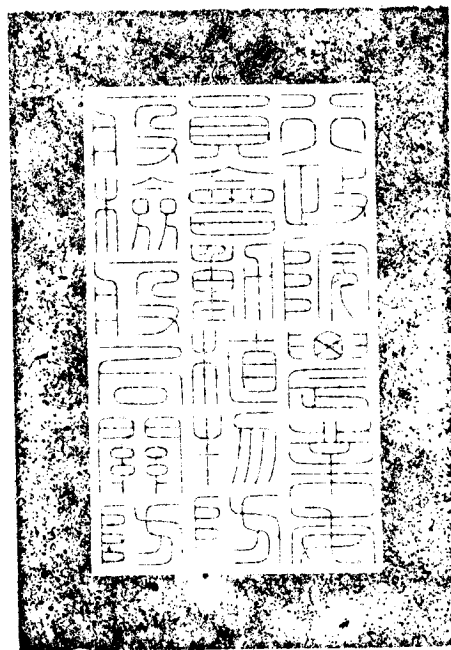


檔 號：
保存年限：

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 令

發文日期：中華民國95年2月23日
發文字號：防檢三字第0951484120號
附件：如文



修正「文心蘭無病毒種苗驗證作業須知」為「文心蘭種苗病毒驗證作業須知」並修正部分規定，自即日生效。

附「文心蘭種苗病毒驗證作業須知」。

副本：本局基隆分局、新竹分局、臺中分局、高雄分局、植物防疫組、植物檢疫組、企劃組、秘書室法制科(均含附件)

局長 宋 華 聰

文心蘭種苗病毒驗證作業須知

一、行政院農業委員會（簡稱農委會）動植物防疫檢疫局（簡稱防檢局）為防止病毒病藉由文心蘭種苗傳播蔓延，以提昇文心蘭種苗及其產品品質，特依據「植物種苗疫病蟲害驗證輔導要點」第三點訂定本須知。

二、本須知用詞定義如下：

（一）文心蘭，指蘭科(Orchidaceae)中之文心蘭屬(*Oncidium*)、蜘蛛蘭屬(*Brassia*)、堇花蘭屬(*Miltonia*)、齒舌蘭屬(*Odontoglossum*)與相關屬及其雜交種之植物。

（二）病毒，指會感染文心蘭之胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*, 簡稱 CMV)、蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, 簡稱 CymMV)及齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, 簡稱 ORSV) (附錄一)。

（三）種苗，指以組織培養技術經由分生組織培養所形成之分生苗及其定植苗。

三、為辦理文心蘭種苗病毒驗證業務，防檢局委託農委會種苗改良繁殖場（簡稱種苗場）為受理機關，負責申請案之受理及發證事宜；委託農委會臺中區農業改良場、農委會臺南區農業改良場及種苗場為檢查機關，負責繁殖圃之設置、操作管理及種苗查驗等檢查工作；委託農委會農業試驗所或經防檢局認證核可之機關（構）為檢定機關，負責病毒之檢定工作。

四、得申請病毒驗證之種苗，包含組織培養瓶苗（簡稱瓶苗）及組織培養定植苗（簡稱定植苗）。

申請瓶苗驗證者，應於母本進行初代無菌化分生繁殖前提出；申請定植苗驗證者，若源自瓶苗者，應於瓶苗出瓶定植前提出，若源自定植苗者，應於移植換盆前提出申請。

母本及各階段種苗之檢查時間，申請者應於申請書中載明。

五、申請種苗病毒驗證者，應填具申請書，向受理機關提出申請，並繳交檢查費。驗證結果於申請者繳交檢定費後由受理機關通知，符合規定之種苗另核發證明書。

六、各級繁殖圃設置及操作管理應符合下列規定：

(一)母本保存園

1.設置條件：母本應隔離栽培於具阻隔病毒媒介昆蟲及軟體動物入侵功能之設施內。

2.操作管理：

(1)母本應在申請驗證前移入符合規定之母本保存園內。母本單株應標示品系並獨立編號，植株間不得相互接觸。

(2)母本保存園應與其他培養場區隔，並嚴格控管人員出入，避免任何人為接觸造成感染之機會。栽培期間使用之盆鉢、介質、器具及花梗固定用器材等，應採用全新資材。

(3)培育過程中植株若需修剪或整理，使用之工具應經附錄二所述方式消毒，並以單株單剪方式為之，以避免植株間之相互污染。

(4)母本保存園應定期施行防治病毒媒介昆蟲及軟體動物之措施。

(5)母本保存園應建立管理紀錄，記錄母本之種植日期及病蟲害防治措施等資料，供檢查人員現場查驗時參考。

(二)組織培養場

1.設置條件：生產瓶苗之組織培養場(簡稱組培場)，應具備高溫高壓消毒設備、置放瓶苗之培養空間、繁殖無病毒瓶苗之無菌操作台及相關儀器設備。

2.操作管理：

組培場管理人員應記錄母本之編號、瓶苗生產數量及批號。瓶苗各繁殖階段之管理應符合以下規定：

- (1)進入組織培養繁殖之初代培養植體，應延續母本編號給與適當批號以利追蹤，各繼代增殖瓶苗亦同。屬於同一品系不同單株所誘發產生之培養植體，在母本擁有者與組培場雙方共識下，得混合成為單一母瓶或重複母瓶，並分別予以適當編號，其數目由雙方決定並告知受理單位，以為後續採樣之依據。
- (2)為建立組織培養母瓶所進行之植物材料消毒與接種，及各階段繼代增殖作業，應於繁殖無病毒瓶苗之無菌操作台內進行。
- (3)繁殖無病毒種苗之無菌操作台內所使用之工具應經附錄二所述方式消毒。工具與操作盤應隨材料批號更換。操作人員工作前應行必要之消毒以避免病原污染。
- (4)組培場應建立管理紀錄，記錄母瓶及各繼代增殖子瓶瓶苗之移植日期等資料，供檢查人員現場查驗時參考。

(三)定植苗培養場

- 1.設置條件：申請定植苗病毒驗證之定植苗培養場設施，應具阻隔病毒媒介昆蟲及軟體動物入侵之功能。
- 2.操作管理：
 - (1)瓶苗定植過程若需浸泡殺菌藥劑或洗滌，同一批號瓶苗以使用經消毒處理之單一容器為限，不同批號不得混用。
 - (2)同一批待驗證瓶苗或定植苗之移植應由專人負責，並不得與其他非驗證瓶苗或定植苗之移植混同進行。
 - (3)移植操作應在消毒工作台上進行，並以新鮮配製之千分之五至千分之六次氯酸鈉溶液處理台面一分鐘以上，再以乾淨紙巾擦乾。
 - (4)操作人員應著專用工作服，進行移植操作前應以肥皂充分洗手，完成不同批號之瓶苗或定植苗定植後，應重複前述之台面消毒處理及充分洗手後方能進行其他批號種苗之移植。工

作服應每日更換，並應以千分之五至千分之六次氯酸鈉溶液處理一分鐘以上後清洗。

(5)瓶苗或定植苗移植時應使用全新盆鉢及栽培介質。移植後之定植苗應整齊排列於植床上，避免葉片重疊，並明確標示來源批號、移植日期及數量，且應依一般預防病毒傳播之要領進行栽培管理。

(6)定植苗培養場應建立管理紀錄，記錄定植苗之定植日期及病蟲害防治措施等資料，供檢查人員現場查驗時參考。

七、病毒檢定種類、檢查程序及檢查方法規定如下：

(一)病毒檢定種類

1.母本：ORSV、CymMV 及 CMV。

2.瓶苗：ORSV 及 CymMV。

3.定植苗：ORSV 及 CymMV。

(二)檢查程序及方法

1.母本

(1)母本保存園之設置及操作管理應符合第六點第一款規定，經檢查人員檢查確認後，始得進行後續採樣檢定。

(2)母本應進行二次檢定，間隔一至二個月，第一次檢定符合分級標準規定者始得進行第二次檢定。第一次檢定採用酵素聯結抗體免疫測定法(簡稱 ELISA)，第二次檢定採用反轉錄聚合酶連鎖反應法(簡稱 RT-PCR)

(3)檢查人員進行採樣時，應以單株為單位，切取適量葉片及根部，置於封口塑膠袋中，標明植株號碼後送交檢定機關進行病毒檢定。採樣時各單株應使用單一工具。

(4)檢定機關應於檢定完成後五個工作日內，將結果通知檢查機關及受理機關。受理機關應於接獲檢定結果五個工作日內，通知申請者繳交檢定費，並於申請者繳費後核發結果通知。

- (5)申請者應將各檢定階段確認感染病毒之母本立即移出保存園，檢查人員應擇期前往現場確認，未依規定移除感染母本者，即終止該申請案之後續驗證程序。

2.瓶苗

- (1)組培場之設置及操作管理應符合第六點第二款規定，經檢查人員檢查確認後，始得進行後續採樣檢定。
- (2)檢查人員以母瓶編號為單位，抽取各母瓶內瓶苗送交檢定機關進行病毒檢定，每一母瓶編號至少抽取一瓶，每一母瓶逢機抽取五個培植體混合為一個樣品，檢定方法採用 RT-PCR。
- (3)檢定機關應於完成母瓶瓶苗檢定後五個工作日內，將結果通知檢查機關及受理機關。受理機關應於接獲檢定結果五個工作日內，通知申請者繳交檢定費，並於申請者繳費後核發結果通知。組培場應於接獲結果通知後立即將不符分級標準規定之母瓶批號移除，始得進行符合分級標準規定批號之繼代增殖及後續驗證程序。
- (4)申請者若委託不同組培場進行繼代繁殖，應於申請時註明，且繼代繁殖組培場之設置及操作管理亦應先經檢查人員查證，符合第六點第二款規定者，始得進行後續驗證程序。
- (5)組培場完成子瓶繼代繁殖後，應主動通知受理機關安排檢查時程。進行子瓶瓶苗之檢查時，檢查人員應核對合格母瓶編號，並抽樣送檢定機關進行檢定。每一編號至少抽取三個子瓶，每一子瓶逢機抽取五個植體混合為一個樣品，檢定方法採用 RT-PCR。
- (6)檢定機關應於完成檢定後五個工作日內，將結果通知檢查機關及受理機關。受理機關應於接獲結果五個工作日內，通知申請者繳交檢定費，並於繳費完成後，始核發結果通知，符合規定之種苗另核發證明書。

3.定植苗

- (1)定植苗培養場之設置及操作管理應符合第六點第三款規定，經檢查人員檢查確認後，始得進行後續採樣檢定。採樣檢定時間由申請者自行預估並於申請書中載明，若有變動應立即通知受理機關。
- (2)定植苗之檢查，由檢查人員抽樣送檢定機關進行檢定，定植苗若領有病毒驗證分級證明之瓶苗者，抽樣比例為千分之五，若未領有病毒驗證分級證明者，抽樣比例百分之一，檢定方法採用 ELISA。
- (3)檢定機關應於完成檢定後五個工作日內，將結果通知檢查機關及受理機關，受理機關應於接獲結果五個工作日內，通知申請者繳交檢定費，並於申請者繳費後核發結果通知，符合規定之種苗另核發證明書。

八、驗證標準及有效期限規定如下：

(一)瓶苗

- 1.母本保存園及組培場之設置及操作管理應符合本須知之規定，並由檢查人員現場查驗確認。經過二次檢定結果均未檢測出 CymMV 及 CMV 二種病毒之母本單株，始得進行分生繁殖。
- 2.母瓶瓶苗及其所增殖之子瓶瓶苗，經 RT-PCR 方式檢定結果符合病毒感染分級標準者，發給病毒檢定證明書。驗證有效期限為自發證日起三個月。
- 3.母瓶瓶苗及其所增殖之子瓶瓶苗，檢定之病毒感染分級標準如下：
 - (1)特優：無 CymMV 及 ORSV 病毒。
 - (2)優良：無 CymMV 病毒。

(二)定植苗

- 1.定植苗培養場之設置及操作管理應符合本須知之規定，並由檢

查人員現場查驗確認，始得進行後續之檢查與抽樣檢定。

2.定植苗經檢查人員抽樣並送交檢定機關檢定，依檢定結果符合病毒感染分級標準者，發給病毒檢定證明書，驗證有效期限為自發證日起三個月。

3.檢測之病毒感染分級標準如下：

(1)特優：無 CymMV 及 ORSV 病毒。

(2)優良：無 CymMV 病毒。

(3)標準：所抽驗之樣品中 CymMV 病毒感染率低於百分之五。

九、收費規定如下：

(一)檢查費：每件申請案收取一千元。

(二)檢定費：依所採用檢定方法及所抽檢樣品數核計；每件母本樣品包含 CymMV、ORSV 及 CMV 三種病毒之檢定，採用 ELISA 者收取三十元，採用 RT-PCR 者收取三百元。

前項費用之收支依照預算程序辦理。

十、為鼓勵文心蘭組培場及定植苗培養場申請種苗病毒驗證，防檢局得成立評選委員會，評選優良之「文心蘭種苗病毒驗證示範生產場」。

附錄一、受檢病毒基本資料

一、齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)

1. 病徵

ORSV 單獨感染文心蘭後，在不同品種上會表現不同之病徵，在絕大多數之切花用蘭西(Gower Ramsey)品種上，通常不會出現明顯病徵，僅在葉片有些微之透化斑，但在火山皇后(Volcano Queen)或哈瓦那(Havana)品種上則經常會出現明顯病徵，常見之病徵為於葉片產生深綠色條紋或不規則形斑塊，但至今仍無資料顯示，本病毒會在文心蘭花部造成病徵。ORSV 單獨對文心蘭植株之生長勢影響不太明顯，若無健康植株作為對照，常無法察覺其感染，而單獨感染本病毒之文心蘭，在組織培養過程中，生長速度明顯低於無病毒植株，但以往因缺乏病毒檢定方法，也不容易被察覺，產業界長久以來一直忽視其存在與重要性，因此，該病毒即在無意間廣為分布。本病毒單獨感染時，雖然對文心蘭之生育影響不大，但若與 CymMV 發生複合感染時，不僅會造成明顯葉部病徵，且對植株生長與開花均有嚴重影響。

2. 病毒特性及傳播方式

ORSV 為煙草嵌紋病毒屬(tobamovirus)之一員，顆粒體為短硬桿狀，長度約 300 nm。該屬病毒之共同特性為性質極穩定，在寄主細胞外耐熱性強，於高達 95°C 的溫度下，仍可存活相當時日。根據日籍學者之報告，ORSV 在 20°C 下，於細胞外可存活至少 10 年之久，為穩定性極高的傳染性病毒。本病毒只能經由機械性傷口入侵植物體內，在組織培養或田間栽培管理過程中，所有可能造成表面傷口之操作，包括傳接、修剪、切花甚至植株葉片間之摩擦，都可能是病毒入侵感染之途徑。截至目前，尚未證實 ORSV 可被任何專一性之媒介昆蟲傳播，但是栽培過程中任何可能在文心蘭植株上造成機械性損傷之昆蟲或小形動物如蟑螂、蝸牛等，亦有促成 ORSV 病毒傳播之可能，應注意防範。

二、東亞蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)

1. 病徵

CymMV 單獨感染開花前之文心蘭幼苗或成株後，大都不會出現明顯病徵，但開花後或老化之植株受感染後，則較有可能出現病徵。常見之病徵為葉背出現斷斷續續之深褐色壞疽型條斑，長度約 0.5-1 公分，條斑部位稍有凹陷，由於此種條斑只發生在葉背，因此常被栽培者忽視甚至誤判為真菌感染所致。CymMV 與 ORSV 一樣，不會在文心蘭花部造成

病徵，但會明顯抑制組織培養中幼苗之生長速度。根據調查，CymMV 在文心蘭園之分佈比 ORSV 更為普遍，此現象應與其單獨感染時不會造成嚴重病徵有關。CymMV 與 ORSV 複合感染文心蘭後，葉部會出現明顯嵌紋、黃化條紋或黃化嵌紋病徵，葉幅與葉長均明顯縮小，植株生育受到抑制，但分芽數反而較正常植株增多，不過每一芽體因為競爭營養之結果，較被感染前縮小，所抽生之花梗較短，分叉數亦減少，爾後隨病勢之進展，植株之生育更形緩慢，對肥料之反應遲鈍，花梗之數量減少，品質亦日漸低落。根據血清學分析結果，在被複合感染之植株體內，不論 ORSV 或 CymMV 之濃度均遠較在被單獨感染之植株中增高許多，因此，這種病株之傳染性遠高於被單獨感染之植株，而蘭園中若被複合感染之植株愈多，則病毒之傳播速度愈快，整個蘭園可能於短期內喪失經營價值。

2. 病毒特性及傳播方式

CymMV 為馬鈴薯 X 病毒屬 (potexvirus) 之成員，此屬病毒在細胞外之穩定性雖不及煙草嵌紋病毒屬，但也是已知病毒屬中性質極為穩定之一屬。其顆粒體為稍可彎曲之桿狀，長度約 450 nm。細胞外耐熱度為 60-70 °C，在室溫下可存活 25 天。目前也尚未發現可以傳播 CymMV 之媒介昆蟲，其傳播途徑與 ORSV 完全相同，均藉由機械性傷口入侵、感染。

三、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

1. 病徵

事實上，迄今文獻中還沒有 CMV 感染文心蘭之正式紀錄。罹染 CMV 之文心蘭葉片上出現與葉脈平行之不明顯黃色條紋，植株大小與一般正常植株無異。

2. 病毒特性及傳播方式

CMV 為胡瓜嵌紋病毒屬 (cucumovirus) 之一員，顆粒體為球形，直徑約 28 nm。寄主範圍極為廣泛，可以感染 85 科 365 屬多達 800 種以上之植物。我國為數極多之重要經濟作物均有被 CMV 感染之紀錄，因此其族群在田間之分布極為普遍。此病毒可以經由機械傷口傳染，但田間主要藉由蚜蟲以非永續型方式媒介傳播，而可以傳播 CMV 之蚜蟲種類為數頗多，這也是此病毒族群廣泛分佈之主要原因。

附錄二、文心蘭繁殖圃設備及操作工具高溫消毒方法

文心蘭各級繁殖圃之設備及操作工具之高溫消毒方法如下：

- 一、乾熱消毒法：利用烘箱在 180℃ 至少維持 1 小時。
- 二、濕熱消毒法：以沸水浸泡至少 15 分鐘。
- 三、火焰消毒法：將工具上接觸過植物汁液之部位以火焰燒烤至少 10-20 秒。