

# 種苗科技專訊-葡萄組織培養與去病毒技術

王至正、陳哲仁、文紀鑾、李美娟、楊佐琦

## 一、前言

葡萄為葡萄科 (Vitaceae) 葡萄屬 (*Vitis*) 之多年生溫帶果樹，全球栽培面積與產量僅次於柑橘。台灣栽培面積約 3100 公頃，年產量約 100,000 公噸，為國內之重要經濟果樹，主要產地在彰化、台中、南投及苗栗等地區，以鮮食用巨峰品種栽培最廣泛。

目前世界上普遍存在葡萄病毒危害問題，國外調查統計，侵染葡萄病毒種類已增加至 20 個屬、55 種之多，其中以葡萄扇葉病毒(Grapevine fanleaf virus, 簡稱 GFLV)、葡萄捲葉病毒(Grapevine leafroll virus, 簡稱 GLRV)、葡萄 A 病毒(Grapevine A virus, 簡稱 GVA)影響最劇，葡萄植株一旦感染病毒，就無法以藥劑處理去除病害。傳統上葡萄以扦插及嫁接繁殖，使病毒累積在植株中並重覆感染，複合侵染及隱性病徵影響導致病毒識別及診斷不易，此外，由於病毒傳染途徑複雜，也使防治更為困難。

近年來，組織培養已成為商業上快速生產無性繁殖植物的方法，此外，利用組織培養繁殖能提供大量且均一材料，方便育種者進行品系比較與選拔，加速育種腳步，並能藉由莖頂生長點培養技術，生產無病毒健康種苗，為農業生產上不可或缺的技術。

## 二、葡萄組織培養

葡萄組織培養研究始自 1944 年，Morel 最早進行葡萄癒傷組織培養，1961 年 Galzy 成功的培養了葡萄莖頂組織，首創葡萄莖節培養技術，1967 年 Mullines 和 Srinivasan 完成了葡萄體細胞胚培養，1978 年 Krul 等從葡萄花藥癒傷組織中誘導出大量不定胚，1978 年 Barlass 和 Skene 建立了葡萄組織培養快速繁殖技術。藉由組織培養技術突破，每月可增殖 2.4~8.2 倍葡萄苗，相較於傳統扦插或嫁接繁殖，組織培養技術大幅提升葡萄種苗生產效率。

### (一) 增殖體消毒與母瓶建立

春季或初夏葡萄枝條生長快速，較適合作為組織培養的材料來源。無論是頂芽或腋芽均可作為繁殖材料，但頂芽體積較大、活力高，操作上較容易。

根據 Susan(2006)研究，葡萄繁殖材料取進實驗室後，先以流水沖洗表面 1 小時，再以吸水布將表面水分吸乾，用刀片切取莖頂約 2 公分小段，在無菌環境下以 70 % 酒精消毒 30~60 秒，之後材料再以 10 % 市售漂白水表面消毒 10 分鐘，然後以無菌水沖洗三次，消毒完成之頂芽以解剖刀切成約 0.2~0.5 公分大小，除去包覆芽體之葉片，完成消毒準備工作，將芽體置於初代培養基中。

葡萄初代培養可採用含維生素之 Murashige and Skoog (MS) 培養基，並添加 1.0 mg/L BA、3% 蔗糖、6.0 g/L 洋菜，酸鹼度調整至 pH 5.8。瓶苗培養環境以 25℃、日照長度 16 小時較適宜。

## (二)增殖繼代階段

葡萄瓶苗增殖目的在於短時間內快速增加繁殖倍率，在培養基中調高細胞分裂素(cytokinin)與生長激素(auxin)之間比例，促使芽體增殖，每3~4週繼代1次，也可使用與初代培養相同培養基，但對於部分根砧用品種(如 Schwarzmann、Riparia Gloire)，Susan(2006)建議採用 1/2 MS 培養基。

## (三)瓶苗發根

培植體莖長至2公分、具有4~5片發育良好葉片時，可以移至發根培養基進行發根，Susan(2006)研究建議葡萄發根採用 1/2 MS 培養基，並添加 1.0 mg/L IAA、1.5 %蔗糖、6.0 g/L 洋菜，調整至 pH 5.8，待根發育完全，約3~9週時間即可移出馴化。

## (四)出瓶健化

因瓶苗生長環境為低光、高濕、恆溫環境，一旦移植到瓶外栽培，容易因失水而萎凋死亡。在瓶苗出瓶栽種之前，需先將瓶苗移至溫室中適應環境改變，馴化時間約3週，瓶苗取出後先洗淨殘留在根部之培養基，再以培養土種植於4吋盆中，剛種完前2週須保持栽培介質濕潤，並置於半遮陰環境，待葡萄苗株成活後，恢復正常照光管理方式。

# 三、葡萄去病毒技術

## (一)莖頂生長點培養

葡萄莖頂生長點培養為使用最廣且快速之去病毒技術，原理是利用染病植株莖頂生長點含病毒很少或無病毒侵染，透過植物組織培養技術切取莖頂尖端進行培養，達到去病毒的目的。

培養之材料可直接從田間取得，經消毒後在顯微鏡下在逐層剝除包覆芽體葉片，使莖頂裸露，切取約0.2~0.5 mm大小且帶1~3葉基源之頂端生長點進行培養。因切取生長點技術門檻高，切芽大小與去病毒成功率成反比，但與芽體成活率呈正比，根據 Susan(2006)研究，進行組織培養後通常只有10~30 %成活率，成活的苗株約有70~100 %能成功去除病毒，簡而言之，採取莖頂生長點培養約有7~30 %比例能得到無毒苗株，再藉由無毒苗株大量繁殖，就能提供產業所需健康種苗。

## (二)熱療處理(thermotherapy)

熱療處理利用某些病毒受熱後不穩定特性，將植株或組織器官置於高溫環境，使植物組織中的病毒部分鈍化或完全失去活性，單獨使用熱療處理去病毒比率較低，通常結合莖頂組織培養技術一同應用。自1983年起，就有專家研究以熱處理技術，自感染 GLRaV 及 GFLV 的葡萄植株重新培養得到健康植株，Panattoni 及 Triolo (2010)以  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  處理染毒葡萄瓶苗，去病毒成功率依染毒

種類而異，GVA 成功率為 70.2%、GFLaV-1 為 25.1%、GLRaV-3 為 24.7%、但在葡萄斑點病毒(Grapevine fleck maculavirus)成功率為零。熱療處理所耗時間長，不適用於對熱敏感葡萄品種，並且有去病毒成功率低之缺點。

### (三)抗病毒藥劑(antiviral drugs)應用

抗病毒藥劑主要作用在病毒複製過程中，藉由酵素干擾病毒 DNA 或 RNA 合成，達到抑制病毒複製目的，Panattoni 等人(2007)研究在葡萄增殖培養基中添加 Ribavirin(Rb) 20  $\mu$  g/ml，培養 90 天後可完全去除 GVA，若於 Rb 20  $\mu$  g/ml 培養基中另添加 Dihydroxypropyladenine (DHPA) 60  $\mu$  g/ml 藥劑，抑制 GVA 效果更佳，培養 30 天後即可得去病毒苗株。

抗病毒劑可與莖頂生長點培養結合使用，去病毒效果更佳，但抗病毒劑本身也影響組培苗生長分化，濃度過高反而造成苗株毒害死亡，使用前仍應進行處理時間及濃度篩選。

### (四)超低溫保存處理(cryopreservation)

超低溫冷凍原為植物種原長期保存方法，但自 1997 年就有專家研究可利用超低溫處理去除感染李子病毒，2004 年同樣技術也應用在香蕉並獲得成功，研究發現超低溫並非直接破壞病毒，而是在長期保存莖頂組織過程中，液態氮造成分生組織基部細胞結凍死亡，阻礙了病毒感染途徑，在 2003 年王等人研究以超低溫保存感染 GVA 之葡萄莖頂組織，再經培養後得到 97%的無病毒苗。

## 四、結語

目前種苗場有進行葡萄健康種苗繁殖生產，品種包括鮮食用巨峰葡萄(一色、櫻井)及砧木用葡萄品種 8B、5C，供應給農友栽培及老樹更新使用，惟田間栽培時仍須注意病毒媒介昆蟲防治工作，如以藥劑燻蒸處理土壤殺死劍線蟲，定期防治柑橘、葡萄粉介殼蟲等媒介昆蟲，冬季修剪後做好田間清園管理，避免再遭傳染。