

# 作物種苗組織培養

## 去除病原體技術應用於健康農法

### 前言

健康農法在經濟、生物與環境三大區塊中，強調健康管理做為三者間調控的樞紐，影響成敗至巨，而健康種苗是生物區塊中的根本，有了健康種苗，除了作物長得好之外，在管理時才能減少或減緩疫情的為害，得到事半功倍的成果。尤其是近期地球氣候暖化與變遷，自然環境生態改變加速環境因子變動，牽引微生物相變化，作物病蟲害增加，導致作物栽培在量、品質與安全兼顧下，藉重組織培養以獲得健康種苗成為首要的手段。

隨著植物科技進步，組織培養技術及去病毒的方法也隨之發展 100 多年，因病毒

(viruses)、類病毒 (viroids)、菌質體 (phytoplasmas) 等病原菌，目前無農藥可有效防治，為使大家瞭解，營養繁殖作物健康種苗組培技術發展，作物得到病毒如何去病毒？依據 Varverid 等人 (2015) 撰寫發表在 *Advances in virus Research* V.61 之整理之「Principles for Supplying Virus-Tested Material」及 Wang 等人 (2018) 撰寫發表在 *Plant Methods* 之所寫 review 報告 (為減少字數，資料來源出處省略)，如下所述：

### 去除病原體 pathogen elimination

針對目前組織培養去除來自植物母本材料的病原體 (病

毒、類病毒、菌質體為主) 生產健康及營養繁殖植物的先決條件、其方法包括熱療法 (thermotherapy)、低溫培養 (Low-temperature therapy)、分生組織培養 (meristem tissue culture)、微體嫁接 (micrografting)、化學療法 (chemotherapy)、冷凍療法 (cryotherapy)。以下分述之：

#### 一、熱療法

熱療法和熱處理 (heat therapy) 是十九世紀末發展出來組織培養去除病毒、類病毒、菌植體比較老的方法，其機制為：

1. 高溫處理或培養可減少病毒朝植物分生組織的移動 (movement)。
2. 高溫處理或培養可減少病毒的複製 (replication)。

3. 高溫處理或培養可促進病毒誘導的RNA 默化 (silencing)。

第一個使用熱療法用於植物的參考文獻是一九六九年《Scottish gardeners》這本書記載用在球根花卉種植前浸泡在熱水中。Kunkel 在一九三六年報告乾熱處理或熱水處理可去除桃黃化病 (peach yellows diseases; 由菌質 (peach yellows phytoplasma) 所引起的); Walkey and Cooper (1975) 也研究溫度對病毒根除的影響, 感染植物培養在 30~40°C 下, 連續 6~12 周使用熱療法可去除葡萄、核果類 (stone fruits)、柑橘、仁果類 (pome fruits)、馬鈴薯、草莓、和其他種的病毒。在不對植物造成嚴重損害甚至死亡的情況下, 從整個植物中清除病毒通常是不可能的。在大多數情況下, 熱療後, 在植物體含有病毒插穗 (cutting) 或芽接 (bud grafting) 從熱處理植物中去除, 利用在植物體上 (*in vivo*) 和離體 (*in vitro*) 分生組織培養繁殖

產生新的無病毒 (virus free; VF) 植物。

或者, 利用組織培養方法, 可縮短去除病毒過程時間。受感染植物的芽以組織培養方法 (圖 1), 然後在 30~40°C 的受控溫度培養箱中培養數天。組織培養或稱離體培養已成功的從杏 (apricot; *Prunus armeniaca*) 的芽體培養 (shoot cultures) 去除蘋果萎黃葉斑點病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*; ACLSV), 從桃 (peach; *Prunus persica*) 的芽

體培養去除桃壞死環斑點病毒 (*Prunus necrotic ring spot virus*; PNRSV) 和 ACLSV, 從酸櫻桃 (sour cherry; *Prunus avium*) 的芽體培養去除加州梅矮病毒 (*Prune dwarf virus*; PDV) 和 ACLSV。

## 二、低溫培養

高溫下的熱療法 (約 37°C) 並不能消除大多數類病毒 (viroid), 因此改用低溫療法。Lizarraga 等人 (1980) 觀察到, 在低溫 (8°C) 生長的馬鈴薯植物芽體中,

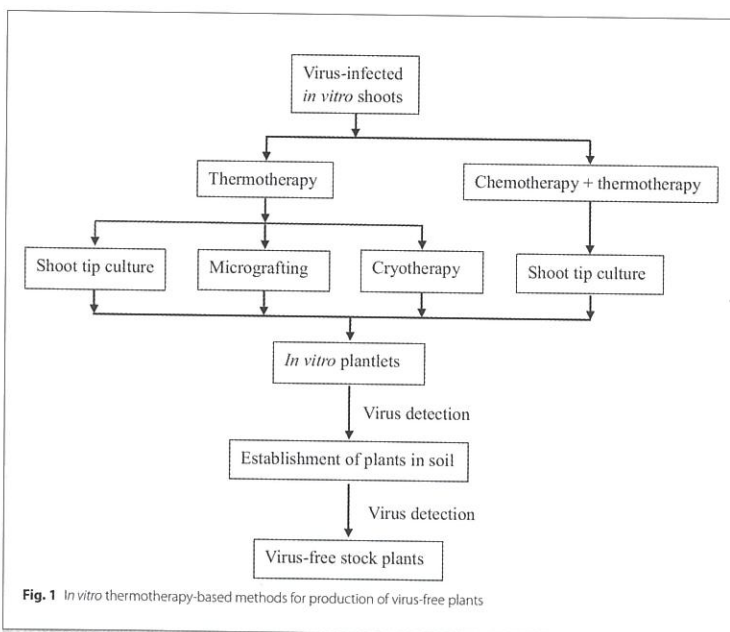


Fig. 1 In vitro thermotherapy-based methods for production of virus-free plants

↑圖1. 熱療法與組織培養結合去除病毒 (Wang et al. 2018)

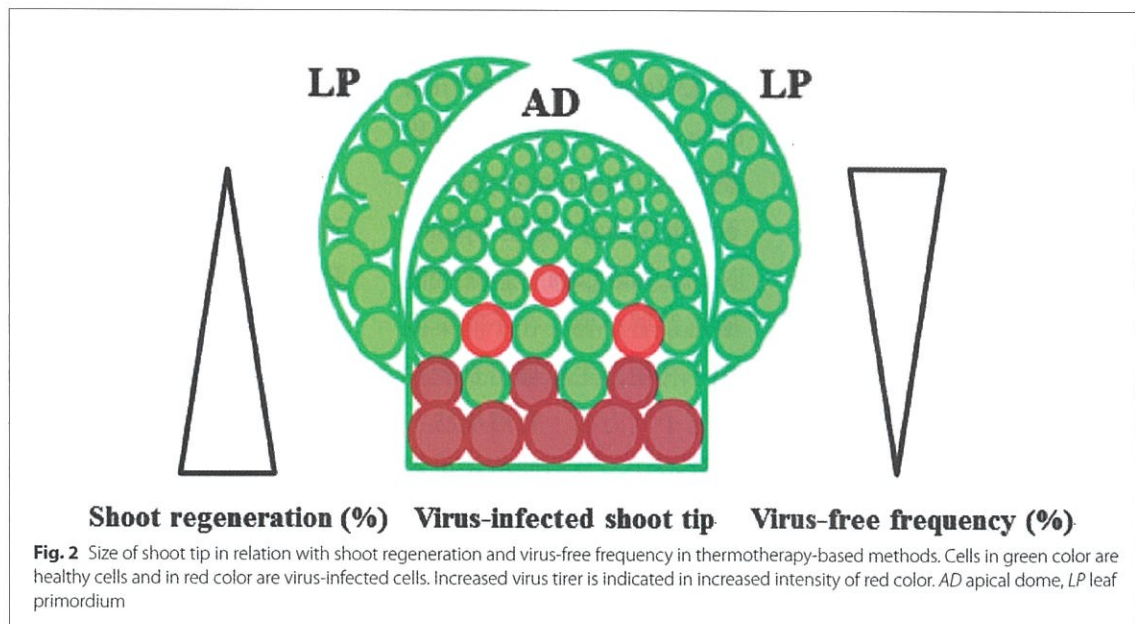
馬鈴薯紡錘狀塊莖類病毒 (Potato spindle tuber viroid; PSTVd) 濃度較低，並成功地利用馬鈴薯芽體切取分生組織培養配合低溫下培養去除 PSTVd。同樣的，Paduch-Cichal and Krczy (1987) 報告，在生長室接受 6 個月的 5°C 生長室培養後，受感染的馬鈴薯芽體可去除 PSTVd，從感染的菊花中去除菊花矮化類病毒 (Chrysanthemum stunt viroid; ChSVd)、菊花萎黃化斑點類病毒 (Chrysanthemum

chlorotic mottle viroid; ChCMVd) 和黃瓜淺果類病毒 (Cucumber pale fruit viroids; CPFVd)。低溫處理配合分生組織培養，可去除梨的蘋果疤痕皮膚類病毒 (Apple scar skin viroid; ASSVd)，從啤酒花去除啤酒花淺花葉類病毒 (Hop latent viroid; HSVd)。

### 三、分生組織培養

大部分營養繁殖植物都是利用分生組織 (包含莖頂分生組織 (shoot apical meristem) 及根尖分生組織 (root apical

meristem)) 之組織培養來去除病毒及相關病原菌，且是植物去除病毒計畫的主要方法。莖分生組織其中包括原始葉 (leaf primordia)，延長轉變成葉及頂端圓頂狀突起 (apical dome)，此處未來發展會延長成莖，因未生成維管束，細胞分裂快速，通常不含病原菌 (圖 2)。Limmaset and Cornuet (1949) 觀察頂芽分生組織 (apical meristem; terminal meristem)，病毒量越來越低，切取頂芽分生組織有機會得到無病毒株。早



↑圖2. 植物頂芽綠色部分為無病毒區域 (Wang et al. 2018)

在 Morel and Martin (1952) 利用大理花切取分生組織培養 (meristem culture)，可建立無病毒植株。Morel 在一九六二以此技術建立蘭花組培苗，在一年內從單一芽中生產出大約 400 萬株基因相同的無病毒植株。莖頂培養 (Shoot tip culture) 指切取莖頂端 0.5~5 公釐，生長點培養 (meristem tip culture; apical meristem culture) 指切取莖頂端 0.1~0.5 公釐，側芽培養 (axillary bud culture; lateral bud culture)。

從感染的母本切取分生組織與去除病毒建立乾淨的培植體，培養在無菌的 MS 培養基中到在土壤中建立生產無病毒苗，為一建立生產無病毒苗技術。其他組織培養去病毒技術尚有癒合組織培養 (callus culture)、原生質體培養 (protoplast culture)，和生殖組織培養 (culture of reproductive tissues)。利用分生組織建立組織培養無病毒植株有許多重要報告已發表，如青蔥去除洋蔥黃矮病毒 (*Onion yellow dwarf*

*virus*; OYDV) 和蔥潛隱病毒 (*Shallot latent viruses*; SLV)；葡萄去除葉捲、黃斑、斑點和夏季斑點病；紅三葉草去除白三葉草嵌紋病毒 (*White clover mosaic virus*; WCMV) 和紅三葉草壞死嵌紋病毒 (*Red clover necrotic mosaic virus*; RCNMV)；白三葉草去除可能類似菌質引起花器葉狀病 (phyllody disease) 和三葉草紅葉病 (clover red leaf disease)；木薯去除木薯嵌紋病毒 (*Cassava mosaic disease*; CMD)；而且，甘蔗可去除甘蔗黃葉病毒 (*Sugarcane yellow leaf virus*; SYLV) 和甘蔗黃化菌質病 (sugarcane yellows phytoplasma)；生產 Spunta, Nicola, and Cara 不同品種健康馬鈴薯小薯；在不同案例中，利用分生組織培養配合其它不同方法，有熱療法、化學療法、及冷凍療法可達到促進去除病原菌。

#### 四、微體嫁接

對於有些植物，如柑橘

類、核果類、和其他木本植物，利用分生組織培養並不能去除病毒，可利用組織培養分生組織嫁接在無病毒砧木 (組培瓶苗) 上，此微體嫁接技術去除病毒和類病毒，第一次成功是在柑橘類、此後許多學者利用此技術生產無病毒柑橘苗。在果樹類應用頂芽嫁接 (Shoot-tip grafting) 技術去除特殊病原菌，成功的例子包括桃、杏仁、李、蘋果、梨、酪梨、腰果。

#### 五、化學療法

在化學療法中，抗病毒化學藥劑著名常用有 acycloguanosine, azidothymidine, acyclovir, ribavirin, or 2-thiouracil。Panattoni 等人二〇一三年之 review 報告，包括 tiazaofurin、selenazofurin (2-pD-ribofuranosylselenazole-4-carboxamide)、benzamide riboside (3-(1-deoxy-pD-ribofuranosyl) benzamide、micophenolic acid、dihydroxypropyladenine、

bitriazolyl compounds、tylophorine B、phenanthrene-based tylophorine derivatives、derivatives of thiadiazoleacetamide、cyanoacrylate derivatives、racemic phenanthroindolizidine alkaloids、pure alkaloids 等加入培養基中，對已感染組織到變成健康組織可達到抑制病毒複製或移動，使用這些化學藥劑可配合生長點培養及微體嫁接技術，可成功去除病毒，得到無病毒株。

當化學療法配合生長點培養，化學藥劑（注意是否需避光或高溫造成分解，及藥劑貯藏溫度）直接加入培養基中，須了解劑量（劑量不足會影響去除病毒效果，過量會造成植物變異或死亡）及不同植物（種類或品種不同，受試母本生理及環境都會影響）及病毒種類（如 DNA 病毒或 RNA 病毒，及植物含病毒量多寡），培養處理（處理時間也是影響因子）後，最後要再經聚合酶連鎖反應（*Polymerase chain reaction*；PCR）等技術檢測

植物，確認是否成功去除病毒。以下介紹成功的例子：Virazole 可去除菸草的胡瓜嵌紋病毒（*Cucumber mosaic virus*；CMV）和馬鈴薯 Y 病毒（*Potato virus Y*；PVY），及配合馬鈴薯腋芽培養去除 PVY 和馬鈴薯 S 病毒（*Potato virus S*；PVS），Hansen and Lane (1985) 在蘋果芽體培養（shoot cultures）使用 ribavirin 可去除 ACLSV，tiazofurin（TR）可去除葡萄的葡萄捲葉相關病毒 -1（*Grapevine leafroll-associated virus 3*；GLRaV-3），Skiada 等人 (2013) 在葡萄「Agiorgitiko」和「Malagouzia」2 品種，以 TR, ribavirin 和 mycophenolic acid，3 種藥劑處理，發現各有效劑量不同，可去除沙地葡萄莖痘相關病毒（*Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*；GRSPaV）。

## 六、冷凍療法

頂芽冷凍療法是冷凍保存技術（cryopreservation technique）應用，頂芽在超

低溫液態氮中保存，再恢復及芽體增殖，達到去除病原菌，其機制主要利用分生組織含水量低，細胞核質比大且含有較少自由水的細胞才能存活及再生，其他分化較成熟的老細胞（感染病毒）在低溫保存後因自由水含量高細胞死亡。因此，液態氮的冷凍會殺死受病毒感染的細胞，使健康（無病毒）細胞存活下來，然後再生成無病原體的植物。結果分生組織在冷凍保存下沒有死亡而保存下來極可能去除病毒成為無病毒株，當與傳統方法比較，如分生組織培養與冷凍療法配合，可取較多數量的芽及較大芽體作冷凍療法，促進頂芽培養得到無病毒株。依賴頂芽培養與冷凍療法配合得到無病毒株為已確定且穩定應用的技術。很多冷凍保存方法受植物遺傳特殊性及冷凍療法應用不同而有限制。

現在脫水技術主要利用玻璃質化，讓液體不結晶凝固，冷凍療法基本上一些步驟包括生產組培苗、頂芽預

先處理條件與欲培養條件、滲透壓保護、冷凍保護、回溫方法和再生長條件等。獲得高有效的冷凍療法，需要建立適當的冷凍保存法來增加非分生組織細胞的致死性。Brison 等人 (1997) 是第一個報導使用頂芽的冷凍療法去除李砧木上的 (*Plum pox virus* ; PPV)，後來也有很多報告使用冷凍療法從感染病毒母株得到無病毒株，從香蕉去除胡瓜嵌紋病毒 CMV 和香蕉條紋病毒 (*Banana streak virus* ; BSV)；從葡萄去除葡萄 A 病毒 (*Grapevine virus A* ; GVA)，從馬鈴薯去除馬鈴薯捲葉病毒 (*Potato leafroll virus* ; PLRV) 和馬鈴薯 Y 病毒 PVY；後來，Volk 等人 (2012) 利用柑橘的冷凍保存頂芽微嫁接去除病害；Beneli 等人 (2013) 注意到很多營養繁殖果樹可用休眠芽體可用作冷凍保存。

## 七、組合的方法

組合上述去除植物特殊病原菌方法，所有案例都以組織培養分生組織培養或頂

芽培養配合熱療法、化學療法、或冷凍療法來完成，也都有報告發表，如下：

### 7.1 熱療法配合分生組織培養或頂芽嫁接

Mulin 等人 (1974) 報告，用熱療法配合分生組織培養去除草莓之草莓輕性黃邊病毒 (*Strawberry mild yellow-edge virus* ; SMYEV)、草莓斑點病毒 (*Strawberry mottle virus* ; SMoV)、和 pallidosis disease-associated viruses。李屬、蘋果屬、香蕉、大蒜用此 2 技術成功得到無病毒株。熱療法配合分生組織培養從梨去除蘋果疤痕皮膚類病毒 (ASSVd)，而且馬鈴薯種薯甘藷、芋和葡萄都用相同方法得到無病毒株。在一九八四年蘇鴻基亦發現臺灣多數柑橘感染此病毒，後用熱療法配合頂芽嫁接成功去除柑橘破葉病毒 (Tatter leaf-citrange stunt virus complex ; *citrus tatter leaf virus* = CTLV)。Koizumi (1984) 在溫州蜜柑用同樣方法也得到相同結果。Maliogk 等人 (2009)

在葡萄「Mantilaria and Prevezaniko」2 品種以熱療法配合分生組織 ( $\leq 0.2$  公釐) 或頂芽培養 (shoot tip culture ;  $\leq 0.5$  公分) 可去除葡萄捲葉相關病毒 - Pr (*Grapevine leafroll associated virus-Pr* ; GLRaV-Pr) 和 GRSPaV 2 病毒複合感染。

### 7.2 化學療法配合組織培養或頂芽嫁接

化學療法配合組織培養去除青蔥的 OYDV 和 SLV；歐洲紅莓 (cv. Lloyd George) 腋芽培養和培養基加入 ribavirin 和 dodecyl-N-methylephedrinium bromide (DMEB) 去除懸鉤子叢矮病毒 (*Raspberry bushy dwarf virus* ; RBDV)；馬鈴薯腋芽 (3~4 公釐) 培養和培養基加入 ribavirin 去除 PVY and PVS；Lim 等人 (1993) 從蘭花 (monopodial orchid hybrid ; *Mokara Char Kuan 'Pink'*) 感染之組培苗或類原球體 (protocorm-like bodie ; PLB) 的薄片培養 (thin section cultures) 配合培養基中加入 ribavirin 去除

蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*; CyMV) 和齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*; ORV); Sedlak 等人 (2011) 使用分生組織配合 ribavirin 去除梨 (Alexander Lucas、Bohemica、Elektra、Rote Williamss) 4 品種的蘋果莖痘斑病毒 (*Apple stem pitting virus*; ASPV); 化學療法結合分生組織培養成功去除柑橘 (kinnow 種) 的 ASPV 和柑橘輪點病毒 (*Citrus ringspot virus*; CRV)。

### 7.3 化學療法、熱療法及分生組織培養法

結合化學療法、熱療法及分生組織培養法 3 種技術去除歐洲甜櫻桃 (sweet cherries) 的 PDV、PNRSV、ACLSV; 從梨去除 ACLSV; 從李屬去除 ACLSV 和 PNRSV; 海棠屬去除 PNRSV。有報告報導利用化學療法、熱療法對病

毒含量在馬鈴薯組培苗生產無病毒株有具體描述。

### 7.4 熱療、及冷凍療法及分生組織培養法

Wang 等人 (2020) 利用此 3 技術去除蘋果的 (Apple stem grooving virus; ASGV) 及青蔥 (*Allium cepa* var. aggregatum) 的 OYDV 和 SLV; Kaya 等人 (2021) 利用此 3 技術去除榛子 (*Corylus avellana*) 的蘋果嵌紋病毒 (*Apple mosaic virus*; ApMV), 因此, 使用熱療法可以提高冷凍療法的療效, 配合組織培養以根除植物病毒。

## 結論

組織培養去病毒的方法, 為提高去除病原體率、增加作物存活率及減少作物變異, 須結合不同 2 個技術以上, 如雞尾酒療法, 二〇二〇以後作物去病毒已發展到冰火療法 (如: 7.4 所述) 3 個技術配合, 現在人類的 COVID-19, 讓我們見識到人與微生物的戰爭, 相同道理, 作物與微生物的戰爭, 應該注意如何去除與防治病原體, 並達到減少微生物變種目的, 以利於達成健康農法的目標。



**聚合精農事業有限公司** 專業供應

**采禾術** 有機農法 適用資材  
專售有機液肥醱酵原料

新發售：破循環～簡易溫室用小包裝吊掛式CO<sub>2</sub>產生袋，使用方便！促進作物同化作用，提高產量及品質！

矽藻土、糖蜜、醱酵用菌、病害拮抗用菌、溶磷菌、苦楝油  
苦茶粕、海鳥磷肥、乳清粉、海草粉、血粉、蝦蟹殼粉  
抗蒸散劑、腐植酸、棕枒灰、葵無露、菌根菌、各式誘蟲紙

服務專線/06-2718430 傳真/06-2722261  
地址：台南市永康區大灣路1044巷15號（崑山科大對面）  
李先生/0932-986960 · E-mail: lwy96@yahoo.com.tw