

頂梢 (生長點) 嫁接改進技術 與柑橘原種無毒化

蘇鴻基

國立台灣大學植病系

摘 要

本省各種柑橘品種母樹普遍感染立枯病(黃龍病)(li-kubin)、萎縮病(*Citrus tristeza virus*)、破葉病(*Tatter leaf virus*)及鱗砧病(*Exocortis viroid*)等系統性似毒素病或毒素病，而一般供繁殖用接穗均帶有一種以上之病毒，以致於柑苗之生長與結果頗受影響。Murashige等(1972)開發之倒T型頂梢嫁接(Shoot-tip grafting)技術廣用於柑橘原種之無毒化，但其成功率低而費時。經本試驗所得下例修改法，其成功率從低於20%可提高達60%以上，並可加速所得無毒芽之增殖效率。將試管中培養4-20天砧木實生枳橙苗切頂，距切端2-3公厘處切0.3-0.4公厘口徑之直角三角形，挖除皮層或小穴，另用皮層做與穴同大之覆蓋，在無菌箱內操作，將消毒過之柑橘原種幼芽生長點(0.2公厘)切取，切面向下放入穴中，然後加蓋。嫁接幼苗放於含液體培養試管中，經二天暗處理後，用紗布包蓋移於溫室培養，二週後除紗蓋，培養2-3週後生長點長出幼芽，就可取出，供為幼苗接穗(1-1.5公分長)，使用臘膜(parafilm)包被，以旁接法(side graft)嫁接到鉢植粗檸檬實生苗(20-30公分)之上方幼莖上。在溫室中培養3個月

左右，長出幼芽生長後，其腋芽，可供芽接增殖，每 3-4 個月可重覆第一次芽接增殖。在一年間從一生長點，可期獲得500左右之無毒芽。此改進法併用熱療法，更可增加無毒化效果。

一、前 言

爲了獲得無病毒之柑橘繁殖用接穗，以降低經由病毒及似病毒所造成之經濟損失，在1972年Murashige等人發展出頂梢嫁接 (STG) 技術，這是第一次嘗試在試管內完成。熱療及利用珠心胚苗亦能獲得無病毒之柑橘植株，但前者對鱗砧病及鱗皮病病原消除效果不佳，後者則需要較長的時間來消除其幼年期不利特性如植株有刺。利用 STG技術則可有效消除病毒而且沒有幼年期的問題。經由Nararro(1981)等人進一步研究與技術改進，可獲得 30-50%的嫁接成活率，移植到土中成活率達 95%，而此大部分經顯微嫁接的植株都不再帶有病毒及似病毒且沒有幼年期特性，因此 STG技術被廣泛應用於消除原種柑橘所帶之病毒及似病毒 (virus and virus-like pathogens)。爲了提高嫁接成活率、操作簡易化、及頂梢嫁接後之快速生長，經由多次 STG實驗，完成目前所使用的改進方法，包括嫁接位置、切割方式、砧苗品種、進一步高成功率增殖和加速生長及繁殖。

二、材 料 與 方 法

STG 改進法：自Navarro (1975) 等人所用之倒T型切割法改進爲直角三角形挖穴法。砧苗方面，除目前所使用之枳橙外柳橙亦可。在無菌狀態下移出二週大之砧苗，距子葉上端1.5-2公分處切除頂端，距切口2-3公厘處自皮層挖出長寬約0.3-0.4公厘之直角三角形的洞，再將商業品種 (表1) 頂端生長良好的幼芽生長點切下約 0.2公厘大小，移入先前挖好的洞裡，讓芽的切面和洞裡的維管束表面或皮層的切面接觸，再蓋上和洞相同大小的皮層組織。用以 STG的接穗品種經檢定往往帶有萎縮病毒、破葉病毒及立枯病病原(表 1)。嫁接幼苗放於含液體培養液之試管中，經二天暗處理後，用紗布包蓋移入 23-35℃溫室培養，二週後除紗蓋，培養2-3週。另依照Navarro等人之方法進行 STG做爲對

照組。

再嫁接法：過去一般方法在STG5-8週後，嫁接成功且在接穗處長 2片葉子的 STG苗才能自試管移出行鉢植。改進方法在 STG 4-6週後將砧木上之接芽切下直接嫁接到溫室生長良好之鉢植砧苗上，可以促進接芽生長。即將自 STG苗莖頂 1-1.5公分處，帶有已發芽之接穗或癒合良好但尚未發芽的一段切下，利用蠟膜，以旁接法嫁接到鉢植粗皮檸檬或柳橙實生苗之上方幼莖上，外圍以PE塑膠袋包被，置於溫室內培育。並於STG後不同時間間隔（4-6週）取出做旁接成功率之比較。

快速繁殖苗木：頂梢芽經STG及旁接到鉢植苗，於溫室內生長約3-4個月可抽出幼枝條。

三、結果與討論

將自芽頂切下含三葉原體之芽點（生長點）置入倒 T字型切口時極容易受到傷害，可能是造成嫁接成活率偏低之原因，一般低於20%（表2）。經實驗操作得知，要將芽點正確置入倒 T字型切口並不容易，反之可輕易地將芽點置入直角三角形洞穴內，且切口可正確貼附維管束表層或皮層切口上而不受到傷害，另在洞穴外輕覆皮層組織，不會對芽點產生壓傷。此外，此薄層覆蓋組織部分常會和洞穴壁的組織再癒合，可維持芽點和砧苗癒合期間內足夠的濕度，而芽點發芽時可突破覆蓋組織長出（圖2-A、B）。自砧苗切頂下 2-3公厘處挖穴，保持穴與切頂間的一段，有助於STG芽的照顧（圖2-C、D）。和倒T字型法比較，本改進法可有效提高嫁接成活率，高達60%以上（表2）。

以本改進法利用多種柑橘接穗品種以柳橙為砧苗之嫁接成活率（75.8%），較目前常用之枳橙的成活率（60%）為高，以倒T字型法利用枳橙為砧苗之嫁接成活率則較低（18.5%）（表2）。大部分的接穗品種，包括椪柑、桶柑、柳橙及白柚，在柳橙砧苗上的 STG成活率極高，但文旦則無論以何者為砧苗皆低於50%。無論將芽點置於維管束表面或皮層切口上，其STG之成功率並無差別。

從整個試驗來看，一個適當的STG程序建議如下。經STG的苗於二天暗處後，以紗布覆蓋移入溫室培養2週，再移除紗布蓋培養2-3週。依據過去方法，此

時自接芽處至少會長出2片葉子，可將此自 STG後生長5-8週的砧苗自試管移出行鉢植。經試驗發現，直接將含 STG芽的一般嫁接到鉢植實生苗的砧木上，可使接穗生長良好，與De Lange (1978) 的報告相符。從表3中得知，STG砧苗經2週成熟期，再加上4週健化期可獲得成功的再嫁接效果。其中再嫁接於粗皮檸檬時需要 5週培養期而柳橙則需 6週。下列所建議之再嫁接方式較為理想。自STG砧苗頂端以下1-1.5公分處切下帶 STG芽一段，將其旁接到生長良好之鉢植粗皮檸檬或甜橙實生苗幼莖上，由於蠟膜具柔韌性，適於捆綁幼芽而不造成傷害，並可讓新生芽突破生長。假如旁接的 STG芽已發芽，則外層再包覆一層PE塑膠袋（圖3B），沒有發芽者，則完全以蠟膜包圍，新生的芽將會突破蠟膜伸長出來（圖3D）。於STG後3-4個月，再嫁接的植株將可提供繁殖用芽。

大部分經STG處理所獲得的苗木，經檢定及ELISA測試，不再帶有萎縮病毒、破葉病毒、鱗砧病病原和立枯病病原。從嘗試自 STG後快速增殖足夠量的苗木之經驗中發現，自STG後3-4個月長出之尚未成熟的芽，其硬度已可以取下再進一步嫁接到粗皮檸檬或甜橙幼莖上，做大量繁殖之工作。如果將接芽上方的莖葉朝另一方向反折，則可以加速接芽的發芽速率。於 STG後一年內，每隔3-3.5個月幼芽再嫁接一次，共三次後，可獲得500個以上的供繁殖的芽體。

表1. 用來做為STG來源之柑橘品種經檢定其感染病害的情形。

品種	病害感染
椪柑	萎縮病、立枯病、破葉病
桶柑	萎縮病、立枯病、破葉病
柳橙	萎縮病、立枯病、破葉病
葡萄柚	萎縮病、立枯病
文旦	立枯病
白柚	立枯病
Eureka檸檬	萎縮病、立枯病
茂谷柑	萎縮病、破葉病

表2. 倒T字型與直角三角形STG法之嫁接成功率比較

嫁接品種	倒T字型法	正直角三角形法	
	枳橙	枳橙	柳橙*
椪柑	2/23	3/5	4/5**
桶柑	2/15	4/5	5/5
柳橙	3/10	3/5	5/5
葡萄柚	5/11	4/6	5/8
文旦	1/12	1/4	2/5
白柚	2/10	3/5	4/5
總數	15/81 (18.5%)	18/30 (60%)	25/33 (75.8%)

*做為STG砧木之品種。

**嫁接成活數目 / 嫁接總數。

表3. 自STG苗頂端切芽做雙嫁接之成功率。

鉢植砧木品種	STG後至雙嫁接之時間（週）		
	4	5	6
粗皮檸檬	4/5	5/5	5/5
柳橙	3/5	4/5	5/5
總數	7/10	9/10	10/10

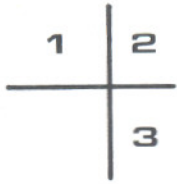
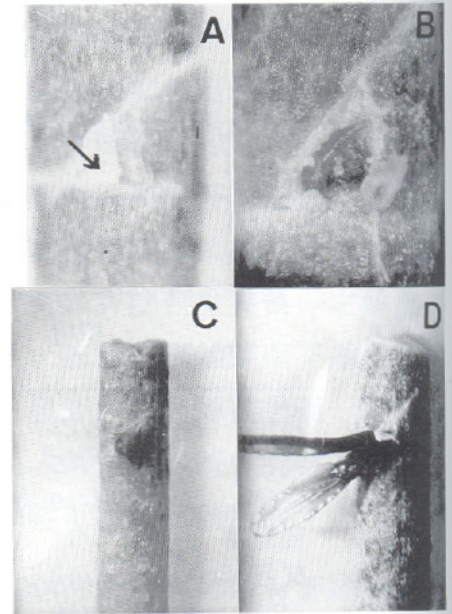
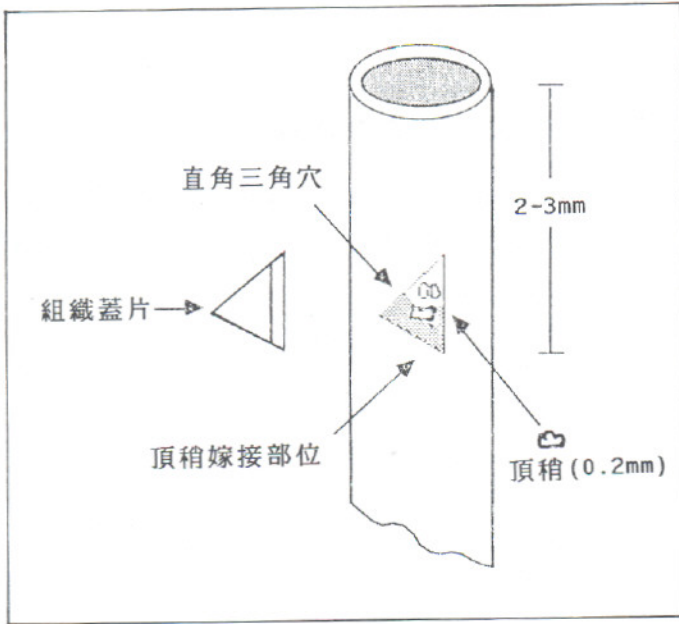


圖 1. 改進 STG 方法之解剖圖，表現直角三角形挖穴和覆蓋用組織。

圖 2. 在皮層的直角三角形穴內嫁接頂芽的生長情形。A. 椪柑頂芽嫁接在柳橙砧木上 4 週後。B. 桶柑頂芽嫁接在枳橙砧木上 4 週後。C. 葡萄柚頂芽嫁接在柳橙砧木上 2 週後。D. 桶柑頂芽嫁接在柳橙砧木上 6 週後，桶柑芽自直角三角形穴內長出葉子。

圖 3. STG 苗莖穗再嫁接之過程。A. STG 苗莖穗（椪柑／枳橙，經 STG 5 週後）用蠟膜固定，旁接在粗皮檸檬砧木上（箭頭所指處）。B. 以 PE 塑膠套住。C. 經旁接 6 週後，自嫁接處長出生長良好的椪柑枝條。D. 經旁接 8 週後，STG 白柚芽（嫁接在枳橙砧上，再旁接到柳橙）自蠟膜包圍處抽出。



四、參考文獻

1. De Lange, J.H. 1978. Shoot-tip grafting - A modified procedure. *Citrus and Subtrop. Fruit I* 539:13-15.
2. Hollings, M. 1965. Disease control through virus-free stock. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3:367-396.
3. Murashige, T., W.P. Bitters, E. M. Naver, C.N. Roistacher, and P. B.Holliday. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. *HortScience* 7:118-119.
4. Navarro, L. 1981. Citrus shoot-tip grafting *in vitro* (STG) and its application: A Review. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 452-456.
5. _____, C.N. Roistacher, and T. Murashige. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J. Amer.Soc. Hort. Sci.* 100:471-479.
6. Roistacher, C. N. 1977. Elimination of citrus pathones in propagative budwood. I. Budwood selection, indexing and thermotherapy. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3:965-972.
7. _____ and S. L. Kitto. 1977. Elimination of additional citrus viruses by shoot-tip grafting *in vitro*. *Plant Dis. Repr.* 61:594-596.
8. _____, L. Navarro, and T. Murashige. 1976. Recovery of citrus cultivars free of several viruses, exocortis viroid and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting *in vitro* pp. 186-192. In E. C. Calavan(ed.), *Proc. 7th Conf. Inf. Organ. Citrus Virol. IOCV*, Riverside.

四、參考文獻

1. De Lange, J.H. 1978. Shoot-tip grafting - A modified procedure. *Citrus and Subtrop. Fruit I* 539:13-15.
2. Hollings, M. 1965. Disease control through virus-free stock. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3:367-396.
3. Murashige, T., W.P. Bitters, E. M. Naver, C.N. Roistacher, and P. B. Holliday. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. *HortScience* 7:118-119.
4. Navarro, L. 1981. Citrus shoot-tip grafting *in vitro* (STG) and its application: A Review. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 452-456.
5. _____, C.N. Roistacher, and T. Murashige. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100:471-479.
6. Roistacher, C. N. 1977. Elimination of citrus pathones in propagative budwood. I. Budwood selection, indexing and thermotherapy. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3:965-972.
7. _____ and S. L. Kitto. 1977. Elimination of additional citrus viruses by shoot-tip grafting *in vitro*. *Plant Dis. Repr.* 61:594-596.
8. _____, L. Navarro, and T. Murashige. 1976. Recovery of citrus cultivars free of several viruses, exocortis viroid and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting *in vitro* pp. 186-192. In E. C. Calavan(ed.), *Proc. 7th Conf. Inf. Organ. Citrus Virol. IOCV*, Riverside.