

四季蔥健康種苗快速繁殖技術¹

1.分蔥潛隱病毒檢測與無病毒新梢之誘導

楊宏瑛² 鄧汀欽³ 張武男⁴

摘要

利用免疫分析檢測分蔥潛隱病毒(SLV)在蔥苗組織內的均勻分佈，據以發展有效率的ELISA 步驟，用來作青蔥健康苗繁殖體系的病毒例行檢測。試以感病之青蔥莖基盤、生長點、生長點帶一枚葉原體、生長點帶二枚葉原體等作為培植體，以培養於固態 MS 培養基中，只有生長點頂分生組織可獲得無病毒青蔥。對無病毒植株加速增殖方法時，TDZ 與 NAA 同時存於 MS 培養基中，會減少新梢產生之數目，所以單獨添加 TDZ 對於誘導新梢產生之效果較佳。莖基盤經 TDZ 濃度 1 mg/L– 5 mg/L 處理 42 日後，約可誘導 43-62 個新梢，即有最佳誘導新梢數目。TDZ 較 BA 或 kinetin 有較佳之效果。

(關鍵字：青蔥，快速繁殖，免疫分析，分蔥潛隱病毒，TDZ)

¹花蓮區農業改良場研究報告第 166 號。本文為第一作者博士論文之一部分。

²行政院農業委員會花蓮區農業改良場副研究員。

³行政院農業委員會農業試驗所副研究員。

⁴國立中興大學園藝系教授。

前言

四季蔥為青蔥(*Allium fistulosum* L.)之一種，宜蘭地區生產面積約 550 公頃，因其品質佳，惟植株不易開花結子，所以一般經濟栽培只能利用分株繁殖，長期分株繁殖，部分植株出現葉片螺旋扭曲或呈現黃條斑紋之情形，類似病毒引起的病徵，部分蔥株呈現無病徵感染(symptomless infection)，但植株生長勢逐漸減弱，經濟產能降低的退化現象。目前已記載感染台灣蔥科作物的病毒種類計有洋蔥黃萎病毒 (onion yellow dwarf potyvirus, OYDV) (周, 1975 ; Chen and Ko, 1979)、大蒜嵌紋病毒 (garlic mosaic potyvirus, GMV) (翁與韓, 1978)、菸草嵌紋病毒 (tobacco mosaic tobamovirus, TMV) (蘇等, 1976)、大蒜潛隱病毒 (garlic latent *carlavirus*, GLV) (鄧等, 1991)、分蔥潛隱病毒 (shallot latent *carlavirus*, SLV) (Barg *et al*, 1994)、大蒜普通潛隱病毒 (garlic common latent *carlavirus*, GCLV) (鄧等, 1999)、韭蔥黃條斑紋病毒 (leek yellow stripe potyvirus, LYSV) (Barg *et al*, 1994)、分蔥黃條斑紋病毒 (shallot yellow stripe potyvirus, SYSV) (Van der Vlugt *et al*, 1999)、璊媒長絲狀病毒 (miteborne filamentous virus, MbFV) (Barg *et al*, 1994)及未經命名的長絲狀病毒等(Barg *et al*, 1994)。其中可能感染青蔥的僅有 SLV、LYSV、SYSV 及 OYDV，另外據 Ko 與 Chen (1978)報告臺灣罹患黃萎病的青蔥亦有似菌質體(MLO)的發現。

蔥科作物之組織培養研究中，以大蒜和分蔥為主，利用生長點培養除去大蒜病毒，國內外均有成果(王、黃, 1974；周等, 1989；楊, 1974；Ayabe and Sumi, 1998；Walkey *et al.*, 1987)。至於青蔥則僅有 Ohkoshi 於 1991 的報告，切取生長點附近 0.3-0.5mm 的分生組織以微體培養，可得 50% 的成活率，而其培育成功的無病毒植株，在田間可增產 67%。生長點培養的微體繁殖過程及無病毒植株種於田間繁殖時，均需追蹤調查病毒感染狀況，因此病毒檢測(virus indexing)是整個繁殖體系成功的要件。至於病毒檢定時，LYSV、SYSV、OYDV 及 MLO 感染青蔥均有明顯病徵可以觀察，唯有 SLV 感染並不造成明顯病徵，需另以免疫分析檢測。

植物細胞雖然具有全能性(totipotency)，但是要發育成為一棵完整之植株，得依靠植物荷爾蒙的幫助。在新梢增殖上，近年來 Thidiazuron (TDZ)被大量用於組織培養，TDZ 早在 1976 年即被德國 Schering AG 公司登記為一種棉花的落葉劑。直到 1982 年被 Mok 等人在誘引菜豆(*Phaseolus lunatus* cv. Kingston)癒傷組織時，TDZ 具有高活性，另外會誘導菸草葉圓片不定芽形成及刺激蘿蔔子葉展開(Mok *et al.*, 1987)。TDZ 比 BAP 或 zeatin 更具生理活性，在組織培養上僅需低濃度，即有一般細胞分裂素之效果，適合組織培養加速繁殖之應用(Visser *et al.*, 1992)。TDZ 之適用濃度及誘導再生途徑視作物而不同，例如在體胚發生上有洋香瓜雄不稔植株以 0.1 mg/L TDZ 與 5 mg/L 2,4-D 的組合可誘導休眠種子之胚軸產生體胚(Gray *et al.*, 1993)、西瓜 18 日未成熟胚以 10 mM 2,4-D 與 0.5 mM TDZ 組合可誘導最多之體胚(Compton and Gray, 1993)、誘導天竺葵之胚軸產生體胚(Qureshi and Saxena, 1995; Murthy *et al.*, 1996)；器官形成上有覆盆子之新梢經 10 mM TDZ 與 1 mM NAA 誘導產生葉片(Marcotrigiano *et al.*, 1996)、康乃馨之花瓣以 0.05 mM TDZ 與 0.5 mM NAA 誘導產生新梢(Frey and Janick, 1991)、誘導天竺葵之根組織產生新梢(Qureshi and Saxena, 1992)等。本報告即探討組織培養技術以快速繁殖四季蔥苗，其間利用 ELISA 檢測病毒，以確認培養再生之小植株的健康性。

材料與方法

一、供試病毒及 ELISA 條件測試

自臺灣青蔥病株分離的分蔥潛隱病毒(SLV-WOtw)(Tsuneyoshi, *et al.*, 1998)，經磨擦接種，保存於 *Chenopodium quinoa* 及 *C. murale* 並回接(back-inoculate)至青蔥植株，待其發病取葉片組織供做試驗材料。免疫酵素分析(ELISA)供試抗體除 SLV-WOtw 的多元抗血清外，亦包括臺灣韭菜 SLV 分離株(SLV-CLtw) (Tsuneyoshi, *et al.*, 1998)的多元抗體。其免疫球蛋白(IgG)的純化及 ELISA 所需試劑的製備依 Clark and Adams(1977)所述。但反應進行採間接法 ELISA，係參考 Koenig(1981)之方法。為測試 ELISA 的最適反應條件及抗原被有效檢出的最低濃度，先以健康與罹病植物葉片以 10 倍量 (W/V)之覆附緩衝液 (coating buffer) 研磨，並經 10 倍系列稀釋，每樣品各抽取 0.1 ml 汁液，二重複，加入微量盤各孔穴內，置 4 隔夜。以 PBST 清洗 3 次後，各孔穴分別加入以聯結緩衝液(conjugate buffer)稀釋 500 倍之 SLV-WOtw 與 SLV-CLtw IgG 各 0.1ml，置於 36 作用 2 小時。以 PBST 清洗 3 次，各孔穴分別加入 0.1ml 稀釋 10000 倍之鹼性磷酸酵素結合之山羊抗兔免疫球蛋白(anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma

A-3687), 置於 36 °C 作用 2 小時, 以 PBST 清洗 3 次, 再加入鹼性磷酸酵素基質溶液(b -nitrophenyl phosphate disodium, 1mg/ml), 置於 36 °C, 反應 60 分鐘, 以 ELISA 讀值機(Multiskan Plus) 測讀在波長 405nm 之吸收值。

二、DTBIA 檢測病毒分佈

利用直接組織印漬免疫分析(direct tissue blotting immunoassay, DTBIA) (Lin *et al*, 1990)檢測病毒在植株內的分佈。以研磨器加壓於感染 SLV 的蔥苗組織, 將全株汁液印漬於 0.45 μ m 的轉漬膜(nitrocellulose membrane, Bio-Rad)上。採樣印漬完成後需待組織液乾燥, 再將轉漬膜浸泡於 5%脫脂奶粉之 TBST 溶液中反應 30 分鐘。將轉漬膜移入稀釋 500 倍之 SLV-WOtw IgG 溶液(1 mg/ml)中反應 2 小時, 以 TBST 溶液震盪洗滌三次, 每次 10 分鐘, 再移入稀釋 10000 倍之鹼性磷酸酵素結合之山羊抗兔免疫球蛋白溶液中繼續反應 2 小時, 再經 TBST 洗滌三次後加入 BCIP/NBT 呈色液 (alkaline phosphatase substrate kit, Bio-Rad)進行反應, 待罹病組織對照組呈現藍黑色反應後, 倒去呈色液, 以自來水沖洗轉漬膜以中止反應。另以接種及未接種的蔥葉萃取液當對照樣品, 經 10 倍系列稀釋後各以 2 μ l 印漬於轉漬膜上, 同時進行點漬免疫分析(dot blotting immunoassay, DBIA) (Fukami, 1991), 以其結果當正負反應判斷之依據。

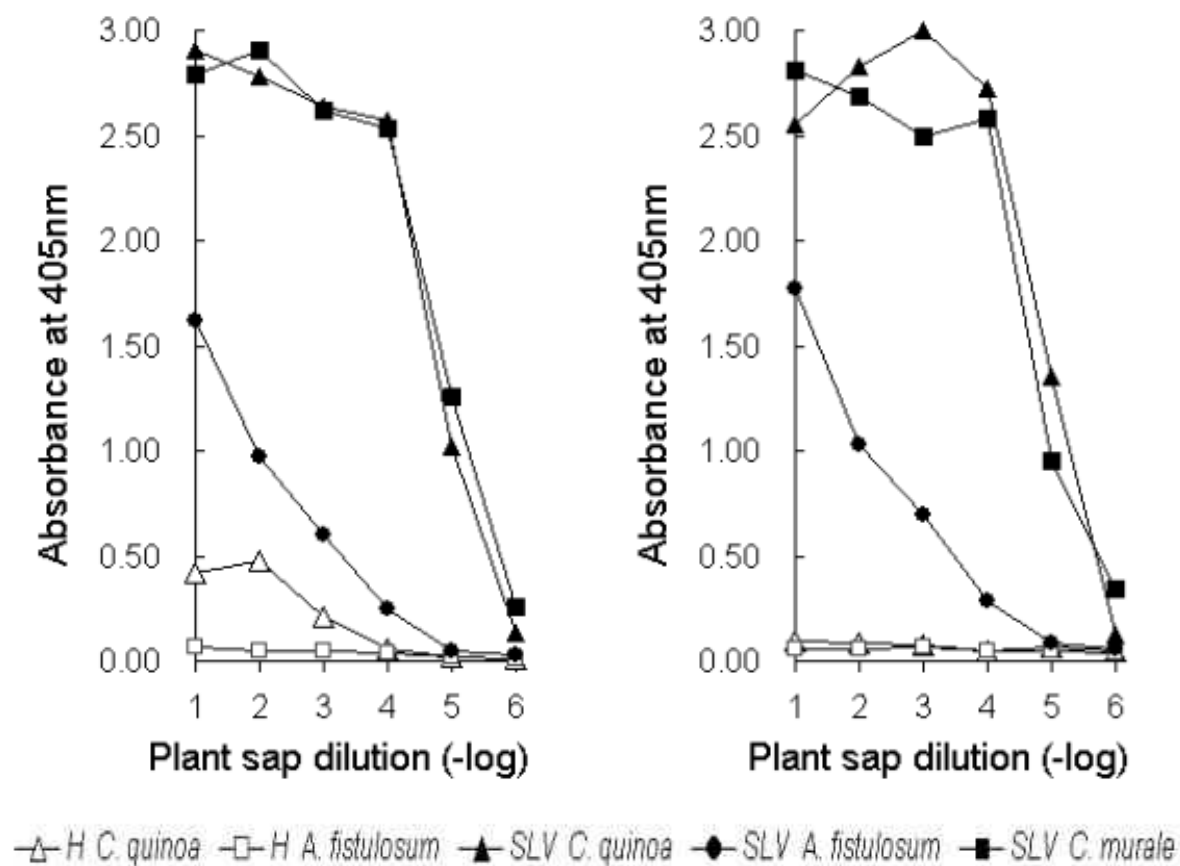
三、健康母株組織培養加速繁殖

選取無蟲害且無病徵之「蘭陽一號」青蔥植株, 並利 ELISA 篩選無 SLV 或帶 SLV 之單株, 種植於消毒過之介質中, 並標記清楚。除去青蔥外葉及根, 切取自莖基盤上蔥白部分約 3cm, 以 70%酒精消毒 1 分鐘, 再以 Clorox 2.5%滴加 Tween20, 消毒 20 分鐘, 經以無菌水洗滌三次後, 利用解剖顯微鏡分別切取生長點、生長點帶一枚葉原體、生長點帶二枚葉原體或整個莖基盤等培植體, 每種培植體以 10 個樣品為一重複, 共 10 重複。分別培養在含有不同濃度(0.1 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L 及 10 mg/L)及種類的植物生長調節劑 NAA (1-naphthaleneacetic acid)、BA (N6-benzyladenine)、Kinetin、TDZ (thidiazuron)之 MS (Murashige and Skoog, 1962)培養基中, pH 調至 5.7 $\pm$ 0.1, 培養基中添加蔗糖 30 mg/L 及洋菜 8 mg/L, 再以高溫 121 °C 與高壓 1.2 kg/cm² 滅菌 20 分鐘。

結果

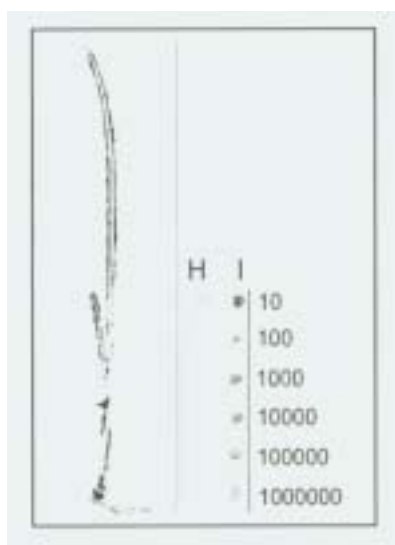
一、ELISA 的反應條件及抗原被有效檢出的最低濃度

以間接法 ELISA 比較 SLV-WOtw 及 SLV-CLtw 兩種抗體對 SLV 的檢出效率, 結果如圖一所示, 在 SLV 感染的蔥葉稀釋至 1/1000 時, 兩抗體皆仍有效測出抗原反應, 而不與健康對照植株起反應。至於兩種抗體對 SLV 接種的 *C. quinoa* 及 *C. murale* 可檢測出 1/100000 稀釋的寄主組織液中病毒高活性反應, 顯現其可用於病毒檢定之高效率指標植物。



圖一、SLV 青蔥分離株(SLV-WOtw,圖左)及韭菜分離株(SLV-CLtw,圖左)的抗體進行免疫酵素分析檢測青蔥 SLV 之活性比較。

Fig. 1 ELISA results of SLV reacted with antibodies of SLV-WOtw (left) or SLV-CLtw (right) in bunching onion virus indexing.



圖二、利用直接組織印漬免疫分析檢測SLV 在蔥株組織分佈 (左圖) , 健康(H)及 SLV 感染(I)的蔥葉汁液經十倍系列稀釋以點漬免疫分析之結果 (左圖)

Fig. 2. SLV distribution in seeding of bunching onion detected by DTBA (left): leaf sap with ten-fold dilutions of healthy (H) and SLV infected plants in dilution serials of leaf sap (right).

二、DTBIA 檢測病毒分佈

利用 DTBIA 檢測 SLV 在蔥苗組織的分佈結果如圖二，全株汁液印漬到轉漬膜上均有病毒反應，其中以莖基盤及蔥葉部份濃度最高。而利用點漬免疫分析汁液稀釋倍數，在稀釋百萬倍之後仍有反應。可以作為以後青蔥採取樣品及樣品用量之參考。

三、青蔥不同培植體帶病毒情形及 TDZ 誘導產生新梢數與生育日數之比較

經 ELISA 檢測帶病毒病植株，分別切取莖基盤、生長點、生長點帶一枚葉原體、生長點帶二枚葉原體，進行培養長成植株後，切取葉片分析，僅生長點分生組織為培植體之植株呈陰性反應，其餘莖基盤、生長點帶一枚葉原體或二枚葉原體皆呈陽性反應。

表一、青蔥不同培植體帶病毒情形

Table 1. ELISA assay in different explant of bunching onion (*A. fistulosum*).

	Stem-disc	Meristem	Meristem with one primordial leaf	Meristem with two primordial leaves
ELISA assay*	+	-	+	+

*The infected virus degree: - non-infected, + + medium infected.

比較莖基盤與生長點作為培植體，結果如表一，以 MS 培養基含 TDZ 誘導產生新梢及出瓶時間之比較，經 0.05mg/L TDZ 處理，生長點產生 1.4 個新梢，莖基盤產生 2.3 個新梢；生長點誘導產生之小苗出瓶日數較莖基盤多 50 日。0.1 mg/L TDZ 處理，誘導生長點產生 3.8 個新梢，莖基盤產生 6.4 個新梢；出瓶日數分別為 200 與 180 日。0.5 mg/L TDZ 處理，生長點增生 6.3 個新梢，莖基盤則產生 19.2 個新梢；出瓶日數分別為 240 與 180 日。1 mg/L TDZ 處理，使生長點產生 10.4 個新梢，莖基盤產生 43.3 個新梢；出瓶日數分別為 240 與 180 日。TDZ 濃度再提高至 5 mg/L TDZ，生長點產生之新梢全部玻璃質化，而莖基盤可產生 66 個新梢，接種後經 200 日可出瓶。

表二、比較 TDZ 誘導青蔥生長點與莖基盤產生新梢數及生育日數之情形

Table 2. Comparison of TDZ on number of shoots and growing days from meristem and stem-disc explants of bunching onion.

TDZ (mg/L)	Shoot number		Growing days	
	Meristem	Stem-disc	Meristem	Stem-disc
0	1.0	1.0	120	120
0.05	1.4	2.3	200	150
0.1	3.8	6.4	200	150
0.5	6.3	19.2	240	180
1	10.4	43.3	240	180
5	-	66.0	-	200

四、利用組織培養技術生產無病毒病之種苗

以 NAA 與 TDZ 誘導莖基盤產生新梢之情形，切取無病毒病之青蔥蘭陽一號之莖基盤，以 0、0.1、0.5、1、5、10 mg/L NAA 及 0、0.1、0.5、1、5、10 mg/L TDZ 不同比例誘導，經二

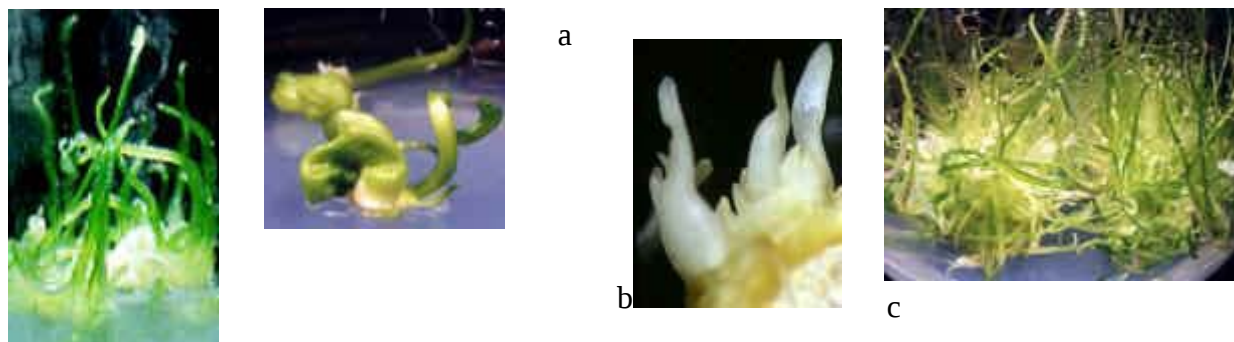
個月後調查新梢產生之結果(詳如表三): 僅有 TDZ 時, 0.1mg/L 可誘導 7 個新梢, 隨濃度增加而增加, 5mg/L 可誘導 62 個新梢, 10mg/L 誘導之新梢降低至 21 個, 乃因 10mg/L TDZ 誘導之新梢容易玻璃質化(圖三), 導致數目減少。TDZ / NAA 為 0/0.1-0.5 mg/L 則產生 1 個新梢, 0/1-10mg/L 僅誘導根部生長。0.1/0.1 mg/L 約誘導 4 個新梢, 0.1/0.5-10 mg/L 降低為 1 個。10/0.1 mg/L 約 42 個, 10/0.5 mg/L 約 37 個, 10/1 mg/L 約 29 個, 10/5 mg/L 約 15 個, 10/10mg/L 約可產生 10 個新梢。換言之, 0.1mg/L TDZ 即有誘導產生新梢之能力, 但是培養基內同時含有 0.5mg/L 之 NAA 即抑制新梢產生, 隨 NAA 濃度增加(0.5-1mg/L), TDZ 濃度需提高至 0.5mg/L 才有誘導新梢之效果。5mg/L NAA 之培養基內 TDZ 需提高至 1mg/L 才有誘導效果, 隨著 TDZ 濃度提高, NAA 濃度減低, 莖基盤產生新梢數目增加, 1-10mg/L NAA 在無 TDZ 情形下, 莖基盤僅產生根, 無新梢生成。其中又以 1mg/L NAA 誘導產生之新根最正常, 5-10mg/L 產生之新根較粗甚至呈平板狀。

表三、NAA 及 TDZ 組合對誘導青蔥莖基盤產生新梢數量之比較

Table 3. Effect of NAA and TDZ combination on shoot numbers from stem-disc explant of bunching onion.

TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)					
	0	0.1	0.5	1	5	10
0	1	1	1	roots	roots	roots
0.1	7	4	1	1	1	1
0.5	19	5	5	6	1	1
1	43	9	9	11	4	1
5	62	29	22	14	11	9
10	21	42	37	29	15	10

莖基盤置於含有 0.5、1 及 5 mg/L TDZ, 每隔七日移出 20 個培植體, 置放於含有 1 mg/L 之 NAA, 經三個月後, 比較在不同濃度及時間下, 誘導產生新梢之情形。TDZ 處理初期莖基盤不斷膨大(圖四 A), 處理時間超過二個月仍無新梢產生。經利用解剖顯微鏡觀察, 5 mg/L TDZ 處理 20 日, 切除外膨大部位後, 莖基盤上已有芽體形成(圖四 B), 移入 1 mg/L NAA 培養基即有新梢產生(圖四 C)。經 7 日 TDZ 各濃度處理皆無誘導新梢之效果, 經 14 日 5 mg/L 可誘導 4 個新梢, 經 21 日 0.5-5 mg/L 分別可產生 3、8 及 26 個新梢。隨時間增加誘導之新梢數逐漸增加, 至第 42 日, 0.5 mg/L 可產生 19 個, 1 mg/L 可產生 43 個, 5 mg/L 可產生 62 個, 若處理時間延長至 49 日, 可誘導之新梢數目與 42 日類似 (詳如圖五)。

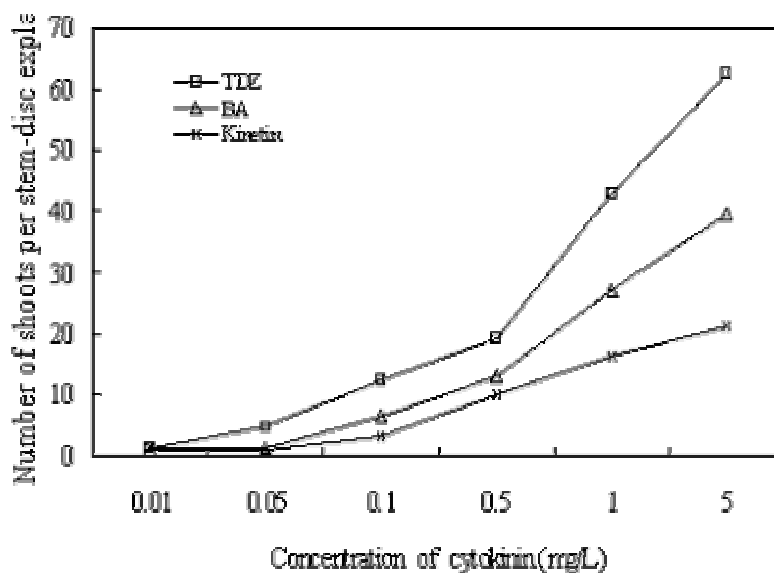


圖三、TDZ 10mg/L 誘導青蔥莖基盤誘導再生新梢玻璃質化情形。

Fig.3. The hyperhydricity of the regenerated shoots were treated by 10mg/L TDZ on stem-disc explant of bunching onion.

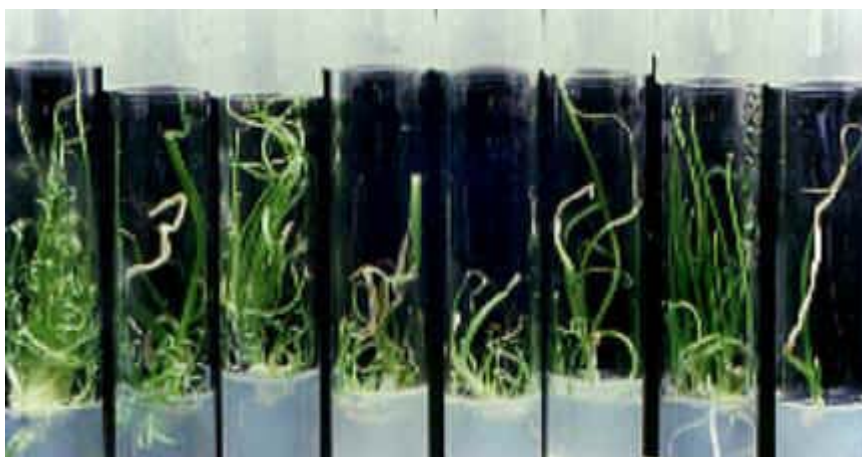
圖四、青蔥莖基盤經 TDZ 5mg/L 處理後再生枝梢形態變化情形，A.莖基盤處理 20 日後之外觀；B.切除外部膨大部分後，內部已有芽體產生；C. 42 日處理後，移入 1mg/L NAA，新梢快速產生。

Fig. 4. Morphological changes and multiplication in stem-disc explant were treated with 5mg/L TDZ of bunching onion. A. The morphology of stem-disc after 20 days treatment. B. After cutting outside leaf, the regenerated shoots were seen. C. After 42 days TDZ treatment and transfer to 1mg/L NAA, the regenerated shoots.



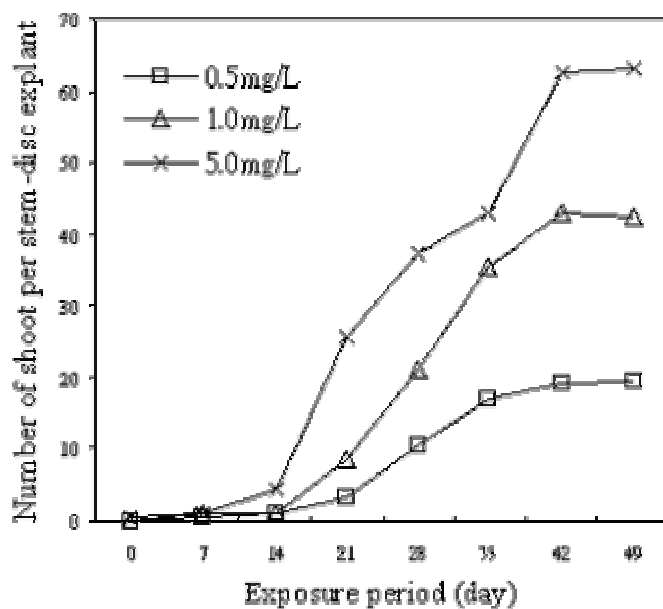
圖五、細胞生長素類型及濃度對青蔥之莖基盤誘導新梢之情形

Fig. 5. Effect of cytokinin types and concentration on number of shoots per stem-disc explant of bunching onion *in vitro*.



圖六、青蔥莖基盤在不同濃度 BA 與 NAA 後新梢產生之情形。a 與 b 在 BA 5 mg/L ; c 與 d 在 1mg/L BA ; e 與 f 在 BA 0.5 mg/L ; g 與 h 不含 BA 為對照；處理 42 日後，試管 a、c、e、g 移入含 NAA 1 mg/L 培養基；b、d、f、h 繼續在 BA 培養基中，一個月後。

Fig. 6. Comparison of the regenerated shoots of stem-discs explant treated with BA and NAA. tube a and b at 5 mg/L BA, tube c and d at 1 mg/L BA, tube e and f at 0.5 mg/L, tube g and h as check without BA. After 42days treatment, tube a, c, e and g were transfer to 1 mg/L NAA medium, tube b, d f and h were remain at BA medium, after one month the regenerated shoots were quite different.



圖七、青蔥莖基盤以不同濃度 TDZ 在不同處理時間誘導產生新梢之效應

Fig. 7. Effect of TDZ concentration and exposure period on shoot regeneration in stem-disc explant of bunching onion.

比較 TDZ、BA 及 kinetin 三者對青蔥莖基盤誘導新梢之效果，BA 與 kinetin 處理後新梢產生情形較類似，在 BA 培養基中二個月即有新梢產生，若移入 1mg/L NAA 培養基產生之新

梢更明顯(如圖六)。依據圖五結果，處理不同細胞分裂素 42 日後，移至 1mg/L NAA 三個月後調查。在 0.05mg/L TDZ、0.1mg/L BA、0.1mg/L kinetin 以上可誘導多個新梢，隨濃度提高，新梢數隨之增加。0.5mg/L 時，TDZ 有 19 個新梢、BA 有 12 個、kinetin 有 10 個新梢。各細胞分裂素為 1mg/L 時，TDZ 可誘導 43 個、BA 可誘導 29 個、kinetin 可誘導 17 個新梢，TDZ 效果較佳。濃度在 5mg/L 時，TDZ 有 62 個、BA 有 39 個、kinetin 有 21 個新梢，詳如圖七。

討論

一、青蔥病毒病與病毒檢測

病毒病是一種系統性病害，植株一旦罹患病毒病，全株各器官都受侵襲，造成產量及品質之降低，且無農用藥劑可以防治，病毒又可隨無性繁殖器官傳遞至下一代，再經媒介傳播即大量蔓延。台灣蔥科作物中大蒜病毒病發生率有報告為 100% (林，1984；林、曾，1988)，經鑑定其病毒種類有 OYDV、TMV、SLV、GCLV、LYSV、SYSV、MbFV 等，至於先前認為造成大蒜嵌紋病的 GMV(翁與韓，1978；Lee *et al.*, 1979)可能是 LYSV 等 potyviruses 複合感染所致(Barg *et al.*, 1997；Bos, L. 1983；Van Dijk, 1993a)，GLV(鄧等，1991；Fukami *et al.*, 1989；Lee *et al.*, 1979；Sako *et al.*, 1991；Sako *et al.*, 1994)已重新歸類為 SLV 的 garlic strain (SLV-G) (Van Dijk, 1993b)，至於青蔥黃條斑紋病毒 (Welsh onion yellow stripe virus, WoYSV) (Liu *et al.*, 1996, Van Dijk, 1993a)已重新鑑定為 SYSV 的一種(Van der Vlugt *et al.*, 1999)。在台灣進行青蔥病毒檢定时，LYSV、SYSV、OYDV 及 MLO 感染青蔥均有明顯病徵可以觀察，在組織培養起步時即可淘汰此類材料，培養當中目視植株出現病徵亦可中止繁殖，唯有 SLV 感染並不造成明顯病徵，需另以免疫分析檢測。SLV 寄主範圍包括大蒜、蔥、洋蔥及韭等蔥科作物，在大蒜軟骨品系有較高的發生率(鄧，1991)，青蔥與大蒜交互感染的機會很高，且呈無病徵系統性感染，多年後感病株即有生長退化的現象。又 SLV 在台灣之蔥及韭上都有分離出來之記錄(鄧，1991；Barg *et al.*, 1994；Tsuneyoshi *et al.*, 1998)，且各分離株之間均有共同的血清反應，因此利用其中一種抗體即可檢測所有的 SLV 型系，本試驗亦證實利用 SLV-WO 或 SLV-CL 的抗體都可經 ELISA 測出蔥株內的 SLV，且在檢體稀釋 1/10 - 1/1000 之間皆為有效濃度，因此例行的病毒檢測時檢體定量只要在此範圍內即可。同時經 DTBIA 顯示 SLV 罹病蔥苗全株組織均有病毒反應，因此在病毒檢測時並不會因為採樣的偏差造成偽陰性(false-negative)的結果。

二、利用組織培養技術生產無病毒病之種苗

無性繁殖之植物營養體一旦感染病毒後，往往造成收量及品質低落，而生長點或莖頂培養，為去除其體內病毒可行方法。本研究以感病之青蔥莖基盤、生長點、生長點帶一枚葉原體、生長點帶二枚葉原體等作為培植體，由於病毒之分佈以維管束為運輸之途徑，而莖基盤或葉原體基部已有維管束分佈(王與黃，1974；Roberts *et al.*, 1997)，試驗結果僅以生長點頂分生組織為培植體，可獲得無病毒青蔥。利用 TDZ 誘導經 240 日培養每個生長點最多可產生 10.4 個植株，相較於田間無性繁殖約可生產 27 株，生產速率較低，張氏(1997)指出健康種苗之增殖量必需能高於病原之再感染率，才能取代田間已感病之個體，降低田間病原密

度，達到延緩病害流行之效果，因此種苗能否大量快速生產乃防治能否成功之關鍵。而在分蔥及大蒜之研究，分別指出切取莖基盤作為微體繁殖之材料，比切取生長點有較多之新梢生成(陳，1997；Ayabe,1998)。青蔥利用莖基盤為培植體，則經 200 日培養，每個莖基盤可產生 66 個植株(如表一)，明顯較生長點生產量為高。若無法獲得無病毒植株，則挑取生長點置放於 MS 培養基發育成植株需 60 日，再切取莖基盤，即可誘導 40-60 個植株，整個時期約 240-260 日與生長點直接誘導產生新梢時間相同，新梢數目卻增加 4 至 6 倍。

TDZ 被大量用於多種作物，在蔥科作物僅分蔥莖頂培養(陳，1997)，表二結果顯示 0.1mg/L TDZ 即有誘導產生新梢之能力，但是 TDZ 與 NAA 同時存在一個培養基中，會減少新梢產生之數目，所以單獨使用 TDZ 對於誘導新梢產生之效果較佳。由圖五得知，莖基盤經 TDZ 處理 42 日即有最佳誘導新梢數目。與 Lu(1993)指出植物在 TDZ 的培養基中最好不要超過 8 星期一致。不同細胞分裂素對青蔥莖基盤誘導新梢之效果比較試驗顯示，TDZ 較 BA 或 kinetin 有較佳之效果，各細胞分裂素為 1mg/L，TDZ 可誘導 43 個、BA 可誘導 29 個、kinetin 可誘導 17 個新梢。5mg/L 時，TDZ 有 62 個、BA 有 39 個、kinetin 有 21 個新梢(如圖七)。因為 TDZ 不易被 cytokinin oxidase 分解，且較 BAP 或 zeatin 具生理活性(Lu，1993)。

致謝

本計畫承蒙行政院農業委員會補助，國立台灣大學園藝系許教授圳塗斧正，國立中興大學植物系林教授金和提供 TDZ 藥劑及園藝系曾教授夢蛟指導挑取生長點等技術使實驗得以順利進行，謹致謝忱。

參考文獻

- 王博仁 黃麗春 1974 大蒜莖頂生長點培養 中國園藝 20:79-87
- 林俊義 1984 大蒜嵌紋病對大蒜產量與品質之研究 中國園藝 30:165-172
- 林昭雄 曾紹均 1988 大蒜無病毒種蒜繁殖 蔬菜作物試驗研究彙報 5:188-192
- 周廷光 1975 台灣石蒜科作物病毒之研究 台灣農業 11(4):119-137
- 周桂珍 曹鳴慶 裘季燕 孫東玲 1989 京郊大蒜病毒病的研究及其鱗莖中病毒的脫除 植物病理學報 19:145-149
- 翁榮南 韓又新 1978 大蒜嵌紋病毒之研究 植保學會 76 年年會論文摘要:3
- 陳宥庄 1997 分蔥健康種苗培養之研究 國立中興大學園藝系碩士論文
- 張清安 1997 本省應用無病毒種苗之回顧與展望 植物保護學會會刊第 39 卷 1：63-70
- 楊秀吉 1974 大蒜的莖頂生長點及組織培養 中國園藝 20:213-218
- 鄧汀欽 蔡淑妮 蔡財旺 1991 大蒜潛隱病毒在臺灣之發生及其生物特性 中華農業研究 40:333-345
- 鄧汀欽 蔡錦惠 廖吉彥 張清安 1999 大蒜普通潛隱病毒之分離與鑑定 植物病理學會刊 8：218-219(摘要)

蘇鴻基 陳永戊 劉慧卿 1976 大蒜嵌紋病之病原研究 植保會刊 18:397

Ayabe, M. and S. Sumi. 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Reports. 17:773-779.

Barg, E., Lesemann, D. E., Vetten, H. J., and Green, S. K. 1994. Identification, partial characterization and distribution of viruses infecting *Allium* crops in south and south-east Asia. Acta Hort. 358:251-258.

Barg, E., Lesemann, D.E., Vetten, H. J., and Green, S. K. 1997. Viruses of *Alliums* and their distribution in different *Allium* crops and geographical regions. Acta Hort. 433:607-616.

Bos, L. 1983. Viruses and virus diseases of *Allium* species. Acta Hort. 127:11-29.

Chen, M. J., and Ko, N. J. 1979. Etiological studies on viruses of garlic in Taiwan. Plant Prot. Bull. 21:220-225.

Clark, M.P., and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.

Eady, C. C. 1995. Towards the transformation of onion (*Allium cepa*). New Zealand J. Crop Hort. Sci. 23:239-250.

Frey, L. and J. Janick. 1991. Organogenesis in carnation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:1108-1112.

Fukami, M., K. T. Natsuaki, F. Motoyoshi and K. Tomaru. 1989. Simple and rapid detection of garlic latent virus from Welsh onions by gelatin particle agglutination test. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 55: 671-675.

Fukami, M. 1991. Detection of onion yellow dwarf virus and garlic latent virus from Welsh onion with dot-immunobinding assay. Proc. Kanto-Tosan Plant Prot. Soc. 38: 79-81

Ko, N. J., and M. J. Chen. 1978. Mycoplasma-like bodies associated with bunching onion yellows. Plant Prot. Bull. 20:83-86.

Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55:53-62.

Gray, D. J., D. W. McColley and, M. E. Compton. 1993. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118:425-432.

Lee, Y. W., S. Yamazaki, T. Osaki and T. Jnouye. 1979. Two elongated viruses in garlic, garlic latent virus and garlic mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 45: 727-734.

Lin, N. S., Hsu, Y. H., and Hsu, H. T. 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopathology 80: 824-828.

- Liu, H. M., Q. P. Zhang and J. R. Li. 1996. Studies on the characteristics of welsh-onion yellow stripe virus. J. Shandong Agri. Univ. 27: 3, 303-310.
- Lu, C. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. In Vitro Cell Dev. Biol. 29:92-96.
- Marcotrigiano, M., S. P. McGlew, G. Hackett and B. Chawla. 1996. Shoot regeneration from tissue-cultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 44:195-199.
- Mok, M. C., D. W. S. Mok, J. E. Tuner, and C. V. Mujer. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. HortScience 22:1194-1197.
- Murthy, B. N. S., R. P. Singh and P. K. Saxena. 1996. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv Ringo Rose) cotyledonary cultures. Plant Cell Report. 15:423-426.
- Ohkoshi, K. 1991. Production of virus-free plants by meristem culture - vegetables and ornamental plants. Tech. Bull. Food & Fertilizer Technology Center. 1991. No. 126, 1-9.
- Qureshi, J. A. and P. K. Saxena. 1992. Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargonium X hortorum* Bailey) varieties. Plant Cell Replication. 11:443-448.
- Roberts, A. G., S. S. Cruz, I. M. Roberts, D. A. M. Prior and R. Turgeon. 1997. Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. The Plant Cell. 9:1381-1396.
- Sako, I., W. Nakasone, K. Okada, S. T. Ohki, T. Osaki and T. Inouye. 1991. Yellow streak of rakkyo (*Allium chinense* G. Don), a newly recognized disease caused by garlic latent virus and onion yellow dwarf virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 57:65-69.
- Sako, I., T. Takami, W. Nakasone, T. Osaki and T. Inouye. 1994. Occurrence of garlic latent virus and onion yellow dwarf virus in seedless Welsh onion (cv. Bozushirazu) and influence of virus reinfection on their yield. Proc. Kansai Plant Protect Soc 36: 21-27.
- Tsuneyoshi, T., T. Matsumi, T. C. Deng, I. Sako and S. Sumi. 1998. Differentiation of *Allium* carlaviruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. Archives of Virology 143: 1093-1107.
- Van der Vlugt, R. A. A., P. Steffens, C. Cuperus, E. Barg, D.E. Lesemann, L. Bos, and H. J. Vetten. 1999. Further evidence that shallot yellow stripe virus (SYSV) is a distinct potyvirus and reidentification of welsh onion yellow stripe virus as a SYSV strain. Phytopathology 89:148-155.
- Van Dijk, P. 1993a. Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. Neth. J. Plant Pathol. 99:1-48.

- Van Dijk, P. 1993b. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. *Neth. J. Plant Pathol.* 99:233-257.
- Visser, C., J. A. Qureshi, R. Gill, and P. K. Saxena. 1992. Morphoregulatory role of thidiazuron.- Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiol.* 99:1704-1707.
- Walkey, D. G. A., Webb, M. J. W., Bolland, C. J., and Miller, A. 1987. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) by meristem-tip culture. *J. Hort. Sci.* 62:211-220.