

# 甘藷病毒 SPV-A 及 SPV-N 消除法之研究<sup>1</sup>

廖嘉信 蔡新聲 盧英權<sup>2</sup>

**摘要：**試驗目的在研究去除甘藷 SPV-A 及 SPV-N 病毒的有效方法。經以不同的熱療法 (heat therapy) 及化學療法 (chemotherapy) 為前處理，配合莖頂培養，得知以恆溫 (38°C) 熱處理時，處理期間長短與獲得無病毒苗的百分率間有極顯著的正相關。變溫熱處理 (38°/32°C) 則無顯著效果。莖頂的大小與獲得無病毒苗百分率間呈顯著的負相關，顯示 SPV-A 及 SPV-N 在莖頂呈不均等分佈，即近分生組織部分之病毒濃度較低或尚未分佈至莖頂。10 ppm 之 kinetin 及 100 ppm 之 2-thiouracil 對 SPV-A 及 SPV-N 病毒的去除具有效果。

甘藷毒素病在本省的發生情形，據嘉義農試分所調查田間 320 個甘藷品種的結果，有 280 個品種在生長期間呈現各種不同毒素病病徵<sup>(1)</sup>。甘藷為無性繁殖作物，植株感染系統性毒素病後，產量銳減，根據國外報導，塊根產量損失高達 10~80%<sup>(6,12,17)</sup>。目前除去罹病株病毒的方法，據前人研究報告有熱療法、化學療法及莖頂或生長點培養法等<sup>(23)</sup>，但感染病毒的甘藷若單以前二者處理，有時因病毒的種類或寄主品種不同而難以完全根除<sup>(2,3,7,15)</sup>，雖然熱療溫度越高，處理所需時間越短<sup>(9)</sup>，但甘藷在 45°C 以上處理時成活率大幅下降，50°C 以上則無法忍受。近年來以適當高溫之熱療為前處理，配合莖頂培養以獲得無病毒株的方法，使多數不易去除的病毒得以根除<sup>(4,14)</sup>。本試驗為探討熱療法及化學療法配合莖頂培養，對甘藷 SPV-A 及 SPV-N 病毒的去除效果，以供為培育無病毒優良甘藷種苗的參考。

## 材料及方法

供試甘藷塊根為取自田間複合感染多種病毒的臺農 63 號，經水洗陰乾後使用，各試驗所用培養基均採用 Murashige 及 Skoog (MS) 之基礎培養基<sup>(18)</sup>，添加 thiamine HCl 0.4 mg/l, folic acid/mg/l, indole-3-acetic acid (IAA)/mg/l, 6-furfuryl adenine (kinetin) 0.2 mg/l, gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) 0.2 mg/l。切取約 1cm 長莖頂，先以 0.5% 次氯酸鈉消毒 10 分鐘，再以無菌水換洗 3 次，在解剖顯微鏡下，以經火焰處理及 70% 酒精冷却除菌之 0.25 mm 皮下注射針尖挑取莖頂，儘速移入培養基表面，切口朝下培養，培養室溫度 25~27°C，光期 16 小時，光度 1500 Lux。

### 莖頂培養的前處理：

1. 熱療法 (1) 恆溫：光期 16 hr 光度 1500 lux 及暗期 8 hr 溫度均為 38°C，(2) 變溫：光期 16 hr 光度 1500 lux，溫度為 38°C，暗期 8 hr 為 32°C，(3) 室溫：25~30°C，光度 2500 lux。 (1)(2) 處理均在植物生長箱內進行，每二週切取 0.8±0.1 mm 大小的莖頂 1 次，進行試管培養。(1)(2)(3) 處理在第八週時分別各切取約 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mm 大小的莖頂進行試管培養。

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第 1061 號。本研究為第一作者碩士論文之部分，研究期間蒙行政院國家科學委員會補助經費，稿成後蒙本所劉大江博士斧正，謹此申謝。

2. 嘉義分所助理研究員，本所農藝系研究員，國立中興大學農藝系教授。臺灣省嘉義市·臺中縣·臺中市。

2. 化學療法：供試藥劑及使用濃度（見表一）。各試劑分別添加於前述改良 MS 基礎培養基中，培養體為由病株取下的 1cm 長莖頂，培養在各處理中 3 週後，各切取  $0.8 \pm 0.1$ mm 大小的莖頂移置於改良 MS 培養基，在  $25 \sim 27^\circ\text{C}$  光期 16 小時，光度 2500 lux 環境下繼續培養。

各試驗所得試管苗在株高 2 cm 以上且根系生長良好時，移置溫室盆植<sup>(10)</sup>。

病毒檢定：分別以指示植物 *Chenopodium quinoa* 測定<sup>(11)</sup>，其呈陰性反應株，再以 Lovrekovich 血清檢定法檢定<sup>(13)</sup>。

## 結 果

### 一、熱處理時間對甘藷病毒去除的處理效果

以  $38^\circ\text{C}$  恆溫及  $38/32^\circ\text{C}$  變溫 2 種前處理之試驗結果，顯示熱處理 12 週期間， $38^\circ\text{C}$  恆溫獲得無病毒苗的比率與處理時間長短呈極顯著正相關 ( $r=0.8749^{**}$ )，即處理時間越長效果越顯著（圖 1），但以  $38/32^\circ\text{C}$  變溫為前處理時，則相關為不顯著 ( $r=0.6058$ )（圖 2），即變溫對 SPV-A

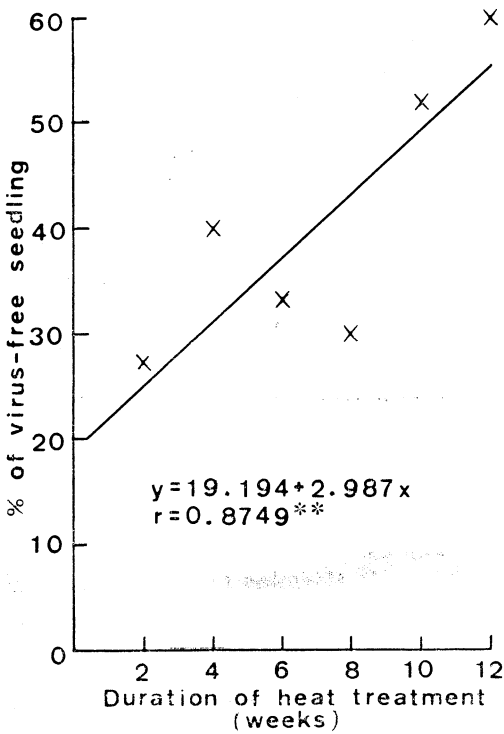


圖 1：38°C 恆溫熱處理配合莖頂培養與獲得無病毒苗比率之關係

Fig. 1. The relationship between the percentage of virus-free seedlings obtained from shoot tip culture and the duration of constant heat treatment ( $38^\circ\text{C}$ ) from virus-infected sweet potato

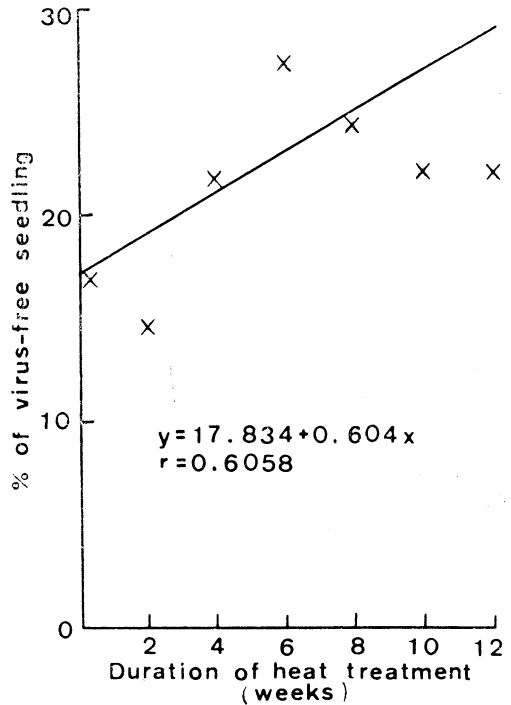


圖 2：38/32°C 變溫熱處理配合莖頂培養與獲得無病毒苗比率之關係

Fig. 2. The relationship between the percentage of virus-free seedlings obtained from shoot tip culture and the duration of alternating heat treatment ( $38/32^\circ\text{C}$ ) from virus-infected sweet potato.

及 SPV-N 病毒的抑制效果不大。二處理的資料所得二迴歸係數，經 t 值測驗結果， $t=2.9054 > t_{(P=0.05)} = 2.228$ ，即  $\beta_1 \neq \beta_2$ ，二迴歸係數差異顯著，顯示恆溫熱處理有意義。

## 二、切取莖頂之大小對甘藷病毒去除的處理效果

由 38°C 恆溫, 33/32°C 變溫及室溫 (25~30°C) 3 種不同前處理, 經 8 週後, 切取不同大小的莖頂, 所得的培養株經病毒檢定結果得知, 莖頂切取的大小與獲得無病毒苗的比率, 在恆溫及室溫時均呈極顯著的負相關 ( $r = -0.9598^*$  及  $-0.9663^{**}$ )(圖 3、4), 變溫時僅呈顯著的負相關 ( $r =$

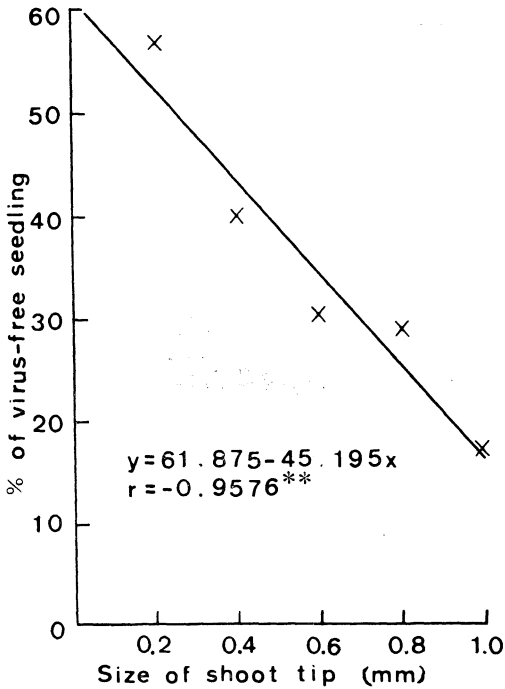


圖 3 : 38°C 恆溫熱處理八週, 莖頂切取培養與獲得無病毒苗比率的關係

Fig. 3. The relationship between the percentage of virus-free seedlings obtained and the size of shoot tip excised from virus-infected sweet potato pretreated by constant high temperature (38°C) for 8 weeks.

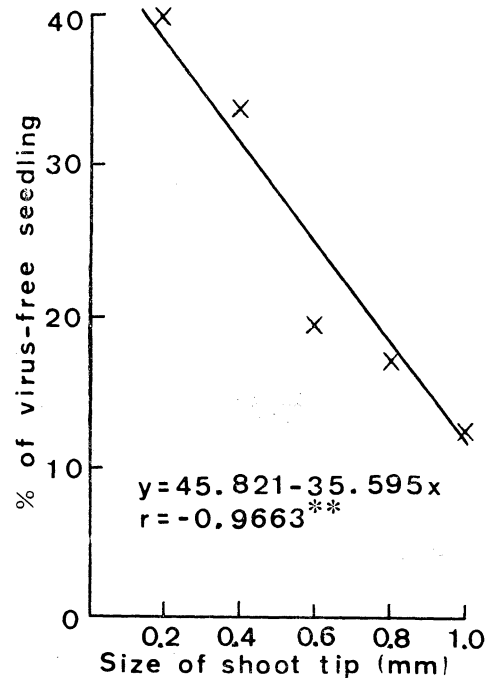


圖 4 : 25~30°C 室溫培植八週, 莖頂切取培養與獲得無病毒苗比率的關係

Fig. 4. The relationship between the percentage of virus-free seedlings obtained and the size of shoot tip excised from virus-infected sweet potato cultivated under room temperature (25~30°C) for 8 weeks.

$-0.8905^*$ ) (圖 5), 但由於 3 處理之迴歸係數差異顯著性測知, 三迴歸係數之間的  $t$  絕對值均小於  $t = \left( \frac{V=6}{P=0.05} \right) = 2.447$ , 即  $\beta_1 = \beta_2 = \beta_3$ , 顯示 3 處理所得結果趨於一致, 說明切取莖頂不同大小獲得無病毒株的比率, 不因前處理的不同而有顯著的影響, 亦即 SPV-A 及 SPV-N 病毒之分佈, 在越近莖頂部分其濃度越低。

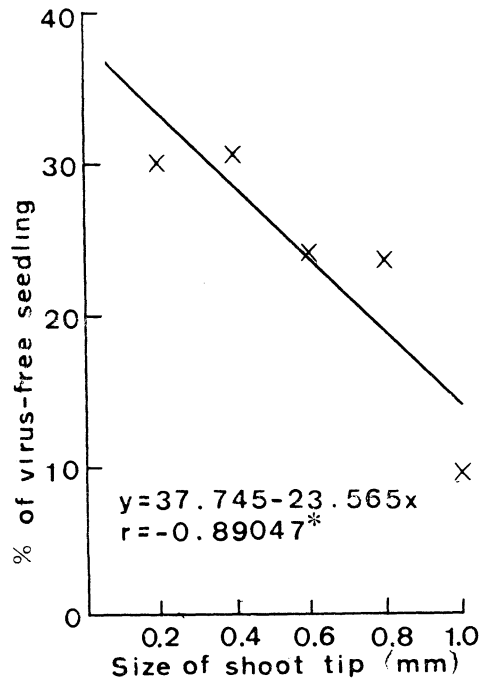


圖 5：38/32°C 變溫熱處理八週，莖頂切取培養與獲得無病毒苗比率的關係

Fig. 5. The relationship between the percentage of virus-free seedlings obtained and the size of shoot tip excised from virus-infected sweet potato pretreated by alternating temperature (38/32°C) for 8 weeks.

### 三、化學療法對甘藷病毒去除的處理效果

由試驗結果示知：改良 MS 培養基添加 kinetin 10 ppm 或 2-thiouracil 100 ppm 時，對 SPV-N 及 SPV-A 病毒均有良好的抑制效果。GA<sub>3</sub> 及 malachite green 則對此病毒不發生影響。(表 1)

表 1. 化學藥劑處理配合莖頂培養對甘藷病毒消除的效果

Table 1. The effect of chemotherapies followed by shoot tip culture on the eradication of SPV-N and SPV-A in sweet potato

Compound	Concentration (ppm)	No. of explant treated	No. of explant survived	No. of plantlet indexed	No. (%) of virus-free plant
2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D)	1	80	32a	—	—
	0.5	80	47a	—	—
6-furfuryl adenine (Kinetin)	1	80	21	19	1( 5.26)
	10	80	21	20	9(45.00)
Gibberellic acid (GA <sub>3</sub> )	1	80	26	26	2( 7.69)
	10	80	19	17	1( 5.88)
Malachite green (MG)	2	80	22	22	0( 0.00)
	4	80	22	21	0( 0.00)
2-thiouracil (TU)	50	80	9	9	0( 0.00)
	100	80	16	16	9(56.25)
Check	—	80	29	29	7( 24.14)

a Only callus developed and no shoot tip could be excised.

## 討 論

甘藷莖頂培養之前處理若以 33 °C 恆溫熱療配合切取 0.8 mm 左右的莖頂培養，獲得無病毒株的比率與熱處理時間長短呈極顯著的相關。變溫處理雖時間長達 12 週，但對病毒的去除影響輕微。可能 SPV-A 及 SPV-N 病毒在 32 °C 時尚具有增殖能力，此結果與在溫室中或夏季高溫期，此 2 種病毒感染病株，較易顯現病徵的事實相吻合，可能此二病毒屬嗜高溫發病的病毒。

切取不同大小的莖頂進行培養，其所獲得無病毒株的比率，3 種不同溫度前處理所得的結果趨於一致，呈極顯著或顯著的負相關，表示病毒的濃度在莖頂附近呈不均等分佈，愈接近生長點部位病毒濃度愈低，與 Kassanis<sup>(8)</sup> 的觀點相符合，但比較 3 種不同溫度前處理，仍以變溫處理的效果較差，與上述 32 °C 適合 SPV-A 或 SPV-N 增殖的假設相吻合。

Raychaudhuri<sup>(20)</sup> 報導 GA 或 2.4-D 在 1 ppm 時對 Chilli mosaic virus 的感染有抑制作用，但本試驗發現甘藷對 2.4-D 很敏感，0.5 ppm 時已足使切離莖頂產生大量癒傷組織，而無法由試管培養中再取得莖頂；在含 GA<sub>3</sub> 的培養基中，雖然培養體生長迅速，發育良好。但 GA<sub>3</sub> 僅促進莖頂下方細胞的分裂與增大<sup>(21)</sup>，可能病毒在處理前已侵入莖頂近生長點部位，而無法除去。Milo (1969) 認為 Cytokinin 抑制病毒增殖，乃因 Cytokinin 可加速側芽細胞分裂與成長<sup>(16)</sup>，本試驗以 10 ppm 的濃度處理結果，顯示有顯著的功效，Takahashi<sup>(22)</sup> 及 Norris<sup>(19)</sup> 認為 malachite green (MG) 對某些病毒的合成具抑制能力，由試驗結果發現 MG 非但對 SPV-A 及 SPV-N 病毒的去除無助益，反而對甘藷的生長有抑制作用，2-thiouracil 對病毒去除的研究甚多<sup>(5)</sup>，一般使用濃度為 100ppm，由試驗結果得知：SPV-A 及 SPV-N 病毒在 2-thiouracil 100 ppm 時，其增殖亦受抑制，但培養體的生長受 2-thiouracil 的影響亦大，故處理後莖頂切離體的存活率大為減低。

## 引用文獻

1. 臺灣省農業試驗所年報 1980 · PP. 93-94.
2. Alconero, R., A. G. Santiago, F. Morales and F. Rodriguez. 1975. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. *Phytopathology* 65 : 767-773,
3. Baker, K. F. 1962. Thermotherapy of planting material. *Phytopathology* 52 : 1244-1255.
4. Berg, L. A. and M. Bustamante. 1974. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. *Phytopathology* 64 : 320-322.
5. Franki, R. I. B. 1962. The inhibition of plant virus multiplication in two host species by 2-thiouracil. *Virology* 17 : 1-8.
6. Hahn, S. K. 1979. Effects of viruses (SPVD) on growth and yield of sweet potato. *Expl. Agri.* 15 : 253-256.
7. Ikegam, Y., K. Mori and N. Yamada. 1964. Elimination of sweet potato mottling mosaic virus by tissue culture. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 29 : 79.
8. Kassanis, B. 1957. The use of tissue cultures to produce virus-free clones from infected potato varieties. *Ann. Appl. Biol.* 45 : 422-427.
9. Kunkel, L. O. 1936. Heat treatments for the cure yellows and other virus diseases of peach. *Phytopathology* 26 : 809-830.
10. Liao, C. H., I. C. Chien, M. L. Chung, R. J. Chiu and Y. H. Han. 1979. A study of sweet potato virus diseases in Taiwan I. Yellow spot virus disease. *J. Agri. Res. China (Taiwan, R. O. C.)* 28 : 127-138. (in Chinese with English summary)
11. Liao, C. H. and M. L. Chung. 1979. Shoot tip culture and virus indexing in sweet potato. *J. Agri. Res. China. (Taiwan, R. O. C.)* 28 : 139-144. (in Chinese with English summary).

12. Lobenstein, C. and I. Harpaz. 1960. Virus diseases of sweet potatoes in Israel. *Phytopathology* 50 : 100-104.
13. Lovrekovich, L. 1959. A simple serological micromethod for detection of potato X virus. *Növenytérmelés* 8 : 73-76 in *Methods in Plant Pathology* (Király, Z. ed. 1974) Res. Insti. Plant Prot., Budapest.
14. MacDonal, D. M. 1973. Heat treatment and meristem culture as a means of freeing potato varieties from virus X and S. *Potato Res.* 16 : 263-269.
15. Martin, W. J. 1962. Attempts to eliminate sweet potato internal cork virus by heat treatments. *Plant Dis. Repr.* 46 : 19-20.
16. Milo, G. E. and S. B. I. Srivastava. 1969. Effects of cytokinins on tobacco mosaic virus production in local lesion and systemic hosts. *Virology* 38 : 26-31.
17. Mukiibi, J. 1977. Effect of mosaic on the yield of sweet potatoes in Uganda. Pages 169-170 in J. Cock., R. MacLntyre and M. Graham (eds.). *Proceedings of the Fourth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops*. International Development Research Center. Ottawa. 277pp.
18. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473-479.
19. Norris, D. O. 1954. Development of virus-free stock of Green Mountain by treatment with malachite green. *Aust. J. Agri. Res.* 5 : 658-663.
20. Raychaudhuri, S. P. 1970. Plant viruses in tissue culture in *Plant Tissue Culture* (H. E. Street and G. G. Henshaw ed. ) Pages 429-460.
21. Sachs, R. M., C. F. Bretz and A. Lang. 1959. Shoot histogenesis : The early effects of gibberellin upon stem elongation in two rosette plants. *Amer. J. Bot.* 46 : 378-384.
22. Takahashi, W. N. 1948. The inhibition of virus increase by malachite green. *Science* 107 : 226.
23. Wang, P. J. and C. Y. Hu. 1980. Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. *Advances in Biochemical Engineering* 18 : 61-99.

## Studies on Eradication of SPV-A and SPV-N Viruses from Infected Sweet Potato<sup>1</sup>

Chia-Hsin Liao<sup>2</sup>, Hsin-Sheng Tsay<sup>3</sup> and Ying-Chuan Lu<sup>4</sup>

### Summary

This study was conducted to test the effects of thermotherapy and chemotherapy on the culture of shoot tips *in vitro* for producing virus-free seedlings from virus infected sweet potato. The duration of constant heat treatment (38°C) of sweet potato plants was positively correlated with the percentage of virus-free seedlings obtained ( $r=0.8749^{**}$ ). On the other hand, no correlation between these two factors was found at day/night temperatures of 33/32°C ( $r=0.6053$ ). The negative correlation between the size of excised shoot tips and the percentage of virus-free seedlings obtained revealed uneven distribution of virus SPV-A and SPV-N in the shoot tips. Lowest concentration of virus at the position closest to the meristem was suggested. Culture medium containing 10 ppm of kinetin or 100 ppm of 2-thiouracil exhibited the inhibitory effect on virus multiplication.

- 
1. Contribution No. 1061 from the Taiwan Agricultural Research Institute. This study was a part of master thesis of the first author, was supported by a grant from National Science Council.
  2. Assistant Agronomist, Chiayi Agricultural Experiment Station, TARI, Chiayi, Taiwan 600, ROC.
  3. Senior Agronomist, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.
  4. Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan 400, ROC.