

利用試管內(*in vitro*)培養技術輔助育種- 抗耐病篩選之探討

農試所生技組 夏奇鋌 曹進義 陳威臣

一、試管內培養作為育種應用之可行性

組織培養技術在農業上最為大家熟知的應用為種苗的大量繁殖，或是以胚培養技術拯救種子內退化的幼胚，協助育種者得到遠緣雜交後代；以及利用花藥培養獲得單倍體或同質雙單元體，作為純系親本加速育種期程等。事實上植物組織培養的立論基礎是建立在植物細胞具有分化的全能性，亦即單一細胞攜有完整的遺傳訊息，具有複製其親本植物之能力，因此利用組織培養技術或稱之為試管內培養 (*in vitro*) 技術於輔助育種在理論上具有可行性。

二、試管內培養作為育種應用之優點

組織培養之培植體除了具有上述細胞分化的全能性外，一般在良好的培養

條件下，不同類型的培植體如細胞、生長點、芽體、根段等，可以在數天至數週內完成數量、體積、或重量的倍加，試管內培植體生長分化所需的時間與全株植物的生長週期相比亦明顯縮短，換言之，在相同時間內利用試管培養的細胞或培植體可以進行較多世代的篩選。此外，組織培養可以在較小的空間內進行大量細胞或培植體的培養，例如利用三角燒瓶進行中藥柴胡的細胞懸浮培養，每毫升培養液中即含有高達 10^5 - 10^6 個柴胡細胞（圖一）；對於一些高危險性的病原菌，若在試管內進行接種篩選，封閉的容器提供了絕佳的隔離保障；尤其針對育種者渴求的創造遺傳變異方



圖一、中藥柴胡之細胞懸浮培養。

作者：夏奇鋌研究員
連絡電話：04-23317327

面，組織培養過程中產生的體細胞變異 (somaclonal variation)、或是以組織培養系統配合物理或化學誘變處理，皆可大幅度提高遺傳變異的產生。綜合言之，試管內培養在創造變異、縮短世代、大量篩選方面皆有優勢，若能運用這些優點於輔助育種之進行，將有助於傳統育種效率的提高。

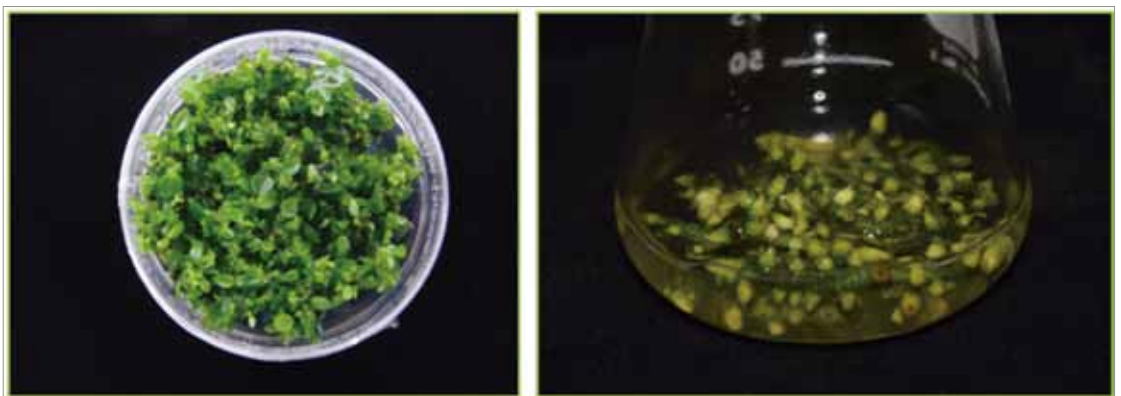
三、成功運用試管內篩選方法於輔助育種之先決條件

利用試管內培養與進行篩選雖然具有許多的優點，但須先釐清一些先決條件的存在，包括1.建立目標植物的試管內培養及其再生技術，這點通常可經由與組織培養專業人員的合作來達成，或是參考發表的文獻建立自有材料的組培系統。理想的培養系統要具有高再生率（圖二）並且能夠誘導產生足夠的變異。2.建立有效的篩選方法，根據育種目標選用適當的篩選劑，篩選劑必須與篩選性狀的改變具有關連性，例如抗耐殺草劑植物的選拔，以殺草劑的主要化學成分

加入細胞培養中，大部分的細胞將受到毒害而死亡，但某些細胞可能因為新酵素產生而具有分解或代謝此一化學成分的能力，亦即產生所謂的抗性；也有一些細胞可能因目標酵素活性的提高而能存活下來，亦即耐受性的提高。3.試管內培植體的表現必須等同於植株田間之表現。若為無性繁殖作物可利用組織培養方法繁殖，可以不考慮篩選特性之遺傳性；若為有性繁殖之植物，則還需確認篩選特性的遺傳性。

四、試管內篩選方法輔助抗耐病育種之可行性

試管內的抗耐病篩選最早見於1973年 Carlson 利用煙草細胞及原生質體培養系統施以 MSO (methionine sulfoximine) 增加誘變率，成功的篩選到抗煙草野火病的植株。一般而言，用來篩選抗耐病的篩選劑可以是病原菌本身、經過殺菌處理之病原菌、病原菌之濾液、由病原菌中分離出來或已知的致病毒素 (phytotoxin/pathotoxin) 以及各種誘引劑



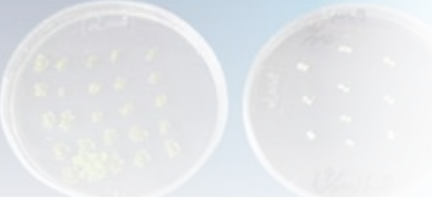
圖二、蝴蝶蘭‘小精靈’（左）與國蘭四季（右）之再生繁殖系統。

等。篩選劑的適當性主要根據我們對於病原菌的致病機制、寄主的防禦反應以及病原菌與植物互動關係的瞭解，亦即病原菌-植物的生物關係越清楚，將有助於選擇正確的篩選劑。試管內的抗耐病篩選最早見於Helgeson (1980) 觀察到抗病煙草品種所誘導之癒合組織顯示抗病特質；而感病品種所誘導之癒合組織則表現出感病特質，這個發現讓大家思考利用試管內培養的植物體代替田間植株作為抗耐病篩選的可行性。筆者曾為文「利用試管內 (*in vitro*) 篩選方法輔助育種之探討」，文中簡單介紹試管內篩選的流程，本篇將針對抗耐病篩選使用之篩選劑加以補充，以及個人對以試管內進行抗耐病篩選的一些淺見。

五、抗耐病篩選劑之類型

病原菌、環境與植物體三者間的交互關係被認為是決定抗、感病最重要的三個因素。在組培系統中，因為環境的條件可以固定，因此較田間接種試驗更能清楚凸顯植物-病原菌間的關係。病原菌的致病機制相當複雜，同一種病原菌可以產生多種不同之病原毒素，以 *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Fao) 為例，可以產生 fusaric, succinic, 3-phenyl lactic acids等，但相同之病原毒素也可能是由不同種之病原菌所產生。在試管內進行抗耐病篩選應該使用何種篩選劑能有效篩出具有抗耐病特性的培植體或植物，牽涉到吾人對病原菌致病機制、植物的抗病機制以及兩者之間的交互關係的瞭解。常用之4種篩選劑為1.病原

菌本身（未經處理），是最簡單也是最直接的篩選劑，但因試管內的環境通常有利於病原菌的生長，而過度生長的病原菌反而不利篩選的控制；換言之，在比較不同來源病原菌系之致病力時，亦可利用試管內培養材料具有高度均一之特性，在瓶外接種病原菌；2.經過滅菌處理之病原菌作為篩選劑，可避免上述活體病原菌作為篩選劑的缺點，例如將培養基覆蓋於經過殺菌處理之病原菌之上，再予以接種培植體以雙層培養的形式進行篩選；3.以過濾處理後之病原菌濾液(culture filtrate) 為篩選劑，一般將病原菌的培養液先以離心方式分離固液相，再將液體部分以0.22 μm 濾膜過濾，濾液成分中可能含有致病之各種毒素或其他與致病相關之代謝物，是較常使用的一種方式；4.利用由病原菌中分離出來或已知的致病毒素作為篩選劑，病原毒素是指真菌或細菌所產生具有致病能力的二次代謝物，分子量小在低濃度即可產生效用。病原毒素通常也是造成植物生病的物質，因此病原毒素應可在培養之病原菌中及罹病植株中發現，且施用此毒素於健康植株應該會產生與接種病原菌相同的病徵。病原毒素依據其化學特性分類有胜肽 (polypeptide)、萜類化合物 (terpenoid)、配醣體 (glycoside)、酚類(phenol)、多醣體 (polysaccharide)，有機酸 (organic acid)、脂肪酸 (fatty acid) 等；依據毒素對於植物體作用的生化特性分類可為生長調節劑類、酵素抑制劑類、抗代謝劑類及細胞壁降解劑類等；依據對寄主專一特性則可分為非寄主



專一性毒素 (Non Host-specific toxin) 與寄主專一性毒素 (Host-specific toxin) 兩種。大家較熟知的一些毒素包括黴菌的黃麴毒素 (aflatoxin)、玉米赤黴烯酮 (zearalenones)、赭麴毒素 (chratoxins)、伏馬鐮孢毒素 (fumonisins) 及鐮孢菌毒素 (trichothecenes) 等。

選擇病原菌濾液或病原毒素作為抗耐病篩選劑之優劣各有看法，通常病原菌中特有之致病毒素已被確認，方能利用特定病原菌毒素作為篩選劑；但並非所有病原菌皆含有致病的毒素或致病的機制已被釐清，因此含有未知致病毒素的病原菌之混合物或濾液，或許能模擬病原菌感染植物之情況。綜合言之，利用病原菌毒素作為篩選劑，比較像施用特定的化學藥劑產生特定的反應，較易篩選出由單一或少數基因所控制之抗病突變體；而利用成分複雜之混合濾液作為篩選劑，可能篩選出由多個非主要基因控制，具有不同程度抗性累積之突變體，因此上述兩種篩選劑之優劣最終可能還要視病原菌於自然環境中演化的快慢而定。

六、結語

過去以抗耐病篩選為目標的試管內篩選研究顯示，約有一半篩選所得之性狀能穩定遺傳，但也有將近半數之研究並未顯示後續之遺傳表現 (van den Bulk 1991)，歸納其共通的3個關鍵問題為1.植株對毒素之抗性是否等同植株對病原菌的抗性？例如育成對鐮孢菌毒素具有抗

性之植株，是否等同植株對於 *Fusarium graminearum* 病原菌具有相同抗性；2.在試管內培養之細胞或培植體表現出抗病性者，是否代表其全株植物 (whole plant) 亦具有相同的抗性表現？3.試管內選得之抗耐病特性必須能夠穩定表現並遺傳，而非在出瓶後或逆境解除後此一特性也隨之消失的表觀遺傳 (epigenetic) 的改變。問題1可隨著植物-病原菌交互關係研究的日益清楚而逐漸清晰，但問題2及3從過去的報告來看，結果較不一致，推測可能與篩選劑、篩選劑與植物組織或細胞作用之形式 (篩選過程)、篩選強度與篩選時間以及再生植株從何而來等許多的因素相關，必須在篩選過程中逐一加以確認，因此試管內篩選若要得到普遍實施，吾人還需對此技術有更精準的認識與瞭解。

過去不乏利用試管內篩選技術於輔助育種的研究，雖然有一些成功的例子，如抗斐濟病毒之甘蔗品種、抗番茄萎凋病生理小種2之番茄新品種 'DNAP-17' 以及抗芹菜黃萎病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*) 之芹菜 'UC-T3' 新品種等，但整體成效並不突出，突顯出此一技術需要更多的研究將關鍵問題逐一釐清。此外，從發表的文獻中可以觀察到一些多年生果樹及無性繁殖作物如草莓、甘蔗 (皆為八倍體)、香蕉 (三倍體) 都曾成功的利用試管內篩選育成新品種，這提示我們無性繁殖作物通常已建立良好的組培系統，利用試管內之體細胞變異進行篩選自然較為便利；

此外不管是自交、異交作物，一般傳統育種藉由雜交將抗病基因導入，再藉由回交恢復原有品種特性，此一作法實施於遺傳率較高的二倍體作物並不困難，但如果面對的是多倍體的異交作物，透過雜交引進的新性狀若為隱性基因控制者，其遺傳模式複雜且遺傳率偏低，意味著育種者必須投入較高的育種成本，而這點剛好是試管內篩選育種的利基，因為只要透過試管內培養的環境刺激，將一些遺傳靜止的基因喚起，或透過誘變育種增加遺傳變異，通過篩選後的突變體通常保留著原品種的大部分特性僅少數基因產生改變，這點對遺傳背景複雜的園藝作物特別有利，例如對於多年生無性繁殖的果樹，利用現行優良品種進行試管內篩選，選得之突變種即可成為一新品種，育種之效益明顯較雜交育種為高；對於不具稔性之作物如三倍體的香蕉，試管內篩選方法可克服遺傳障礙育成新品種。綜合言之，試管內篩選方法用於抗耐病輔助育種需要組培研究人員、植病專家與育種者間密切的合作，而試管內篩選方法是否可成為一種有效率的育種工具，端看育種者對於作物以及育種工具的特性能否充份的瞭解與掌握，成功的育種策略應該思考以最適當的育種工具或方法來提高育種效率並達成目標。

七、參考文獻

夏奇鈺、陳威臣、曹進義。2014。利用試管內(*in vitro*)篩選方法輔助育種之探

討。技術服務季刊99:11-14。

- Carlson P. S. 1973. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science* 180: 1366-1368.
- Helgeson J. P. and G. T. Haberlach. 1980. Disease resistance studies with tissue culture. p.179-184. in: *Tissue culture methods for plant pathologists*. (Ingram D. S. and Helgeson J. P. eds) Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Lebeda A. and L. Švábová. 2010. In vitro screening methods for assessing plant disease resistance. p.5-46. in: *Mass screening techniques for selecting crops resistant to disease*. International atomic energy agency. Vienna, Austria.
- Remotti P. C. 1998. Somaclonal variation and in vitro selection for crop improvement. p.169-201. in: *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. (Jain S. M. et al. eds.) Kluwer Academic publishers. Boston, USA.
- Švábová L. and A. Lebeda. 2005. In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *J. Phytopath.* 153:52-64.
- van den Bulk R. W. 1991. Application of cell and tissue culture and in vitro selection for disease resistance breeding- a review. *Euphytica* 56: 269-285.