

小花蕙蘭無特定病毒 優質種苗繁殖體系之建構

農試所生技組 陳威臣 夏奇鈺 曹進義

農試所植病組 陳金枝

一、前言

小花蕙蘭(國蘭)為僅次於蝴蝶蘭與文心蘭之外銷蘭花，主要銷往韓國與中國。小花蕙蘭慣用無性繁殖分株方法生產種苗，此方法常因母本帶有病毒而使大量種苗遭受病毒汙染，因而無法提升商品價值。普遍感染小花蕙蘭的病毒為蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)與齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)，此兩種病毒對小花蕙蘭產業經濟影響最深，因此建立病毒檢測技術是確保無特定病毒優質種苗生產的重要措施。本文主要介紹玉華四季蘭(*Cybidium ensifolium* var. Uie Hwa)分生苗繁殖過程中結合特定病毒檢測技術，用以建構小花蕙蘭無特定病毒之種苗生產體系，期能有助於產業發展。

二、小花蕙蘭病毒檢測與病毒病之防治方法

病毒病(virus diseases)容易隨著分株繁殖而傳播到後代種苗，蘭友大多稱之

為「毒素病」或「拜拉斯」。蕙蘭嵌紋病毒(CymMV)與齒舌蘭輪斑病毒(ORSV)常見於小花蕙蘭，在建構小花蕙蘭無特定病毒種苗生產體系時，首先就是要建立CymMV與ORSV的檢測方法。目前常用酵素連結免疫吸附反應(ELISA)與反轉錄核酸聚合酶連鎖反應(RT-PCR)技術檢測蘭株是否感染病毒，其中ELISA法的成本較低且操作較簡便，可適用於大量樣品的病毒篩檢；RT-PCR法則是針對病毒核酸分子進行偵測，其敏感度較ELISA法為高，但在設備與人員訓練上就有較高的要求，常用於少量樣品且精確度要求較高的病毒檢測。

植物感染病毒後常呈現系統性分佈，而近年來已有許多證據顯示病毒於病株並非均勻分佈，因此採樣方法會影響檢測結果。根據本研究以往試驗結果顯示，小花蕙蘭蘭株鞘葉是病毒檢出率較高的部位，即使是已枯萎的鞘葉仍可順利檢出病毒，可做為檢測時的取樣部位。此外，病毒在感染蘭株後會有段潛伏期，此後病毒將慢慢繁殖且逐漸分佈到全株，感染初期病毒的濃度極低而未被偵測出來，因此在不同季節或是至少進行二次檢定，期間需間隔2-3個月，二

作者：陳威臣助理研究員
連絡電話：04-23317326

次均未檢出病毒時才能做為無特定病毒之蘭株親本；亦可搭配RT-PCR法重複檢測，尤其是做為組織培養培植體來源的植株，最好是經過RT-PCR法檢測確認。

經過檢測不帶特定病毒之健康蘭株進行組織培養分生繁殖，在組培流程之查核點進行瓶苗檢測確認無特定病毒感染，瓶苗出瓶後需注意栽培管理方式，避免病毒病之感染與傳播。由於組培苗養成種苗的時間約需2-3年，因此育苗的過程中建議在隔離的溫室或網室中進行，且在每次分株作業須謹守病毒病防治方法(謝廷芳等，2010；陳威臣等，2011)；並於栽培過程中之檢測點進行特定病毒檢測，確保蘭株未再受到特定病毒的感染。

CymMV與ORSV可長期存活於栽培環境並藉由傷口感染小花蕙蘭植株，因此生產過程中的分株、除葉、除花等操作都會增加病毒感染的機會，甚至葉片摩擦產生的傷口都是病毒的傳播途徑。「預防」是目前防治病毒病的主要概念，因此以無特定病毒的母本作為繁殖親本源，再配合栽培過程中避免病毒感染的措施，才能有效控制病毒病(袁雅芬，2010；陳威臣等，2016)。

三、玉華四季蘭組織培養實生苗與分生苗繁殖技術簡介

小花蕙蘭組織培養種苗繁殖有兩種方式，其一為利用未熟胚(immatuere embryo)進行無菌播種後長成的實生苗，其二是以芽切法生產與母本具有相同特性的分生苗。實生苗生產技術雖然可獲

得大量種苗，但此方式所得種苗是透過有性繁殖方式而來，無法保有母本特有的葉藝或花藝性狀。因此，若是為維持品種的特殊性狀，利用無性繁殖是較佳的方式；選取優良蘭株的側芽作為培植體，誘導芽體增殖以大量生產種苗，理論上經由此一過程所生產的植株均與其優良母本的性狀完全一致。

就小花蕙蘭的組織培養種苗繁殖體系而言，實生苗與分生苗的繁殖方式除了遺傳特性與培植體來源的差異外，整個量產操作流程大致相同(圖一)；但在培養基組成上則有些微的差異，主要在於細胞分裂素(cytokinins)與生長素(auxins)濃度的變化應用。此外，兩者在初代培養的除菌難易度，以及誘導培養基均有著極大的差異；實生繁殖法之果莖除菌的成功率高，而分生苗繁殖途徑須利用取自於優良母本的新生側芽，在除菌接種後誘導芽體或根莖形成，後者在於除菌操作成功率與芽體誘導方面，較實生繁殖法相對困難。

小花蕙蘭組織培養種苗在量化過程中須控制繁殖倍率，因為根莖增殖倍率太高將形成瘦弱之根莖，以至於從中誘導所得的葉芽苗品質不佳，在葉芽增殖階段也有相似問題，會導致組培苗不夠健壯，因此在馴化栽培後之成活率低。小花蕙蘭組培技術自培養開始到組培苗出瓶栽培，需經過1.5-2年的時間，若需達到較高之數量時，則耗費的時間會更長；因此瓶內培養時間太長是組培苗繁殖體系需要面對的問題，如何縮短種苗養成時間即為成功的關鍵所在。

四、小花蕙蘭無特定病毒優質種苗量產體系之建構

農業試驗所於前期研究中經由未熟胚播種所得之小花蕙蘭實生苗，經CymMV與ORSV之病毒檢測結果顯示，均未檢出病毒，符合一般認為病毒並不會經由種子傳播的觀點，因此實生苗應可做為健康種苗來源。以下主要介紹分生苗繁殖流程中特定病毒檢測程序，包括檢測點、檢測法及取樣技術的訂定與建立。

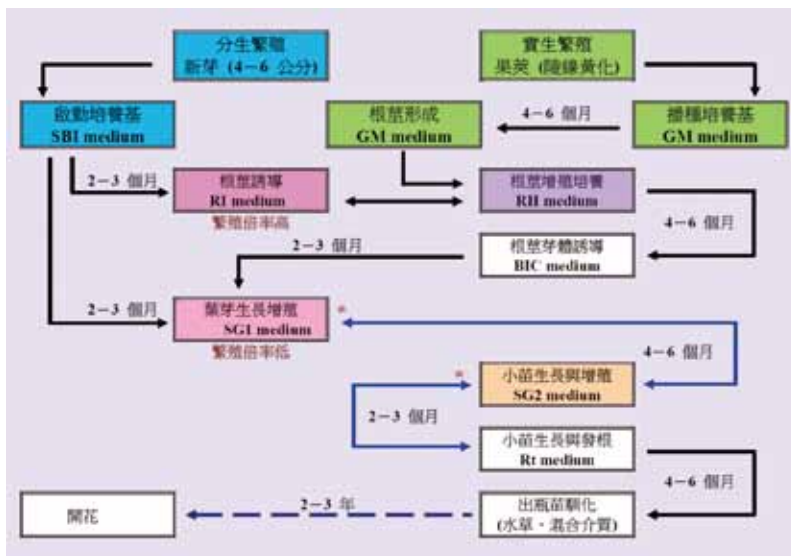
玉華四季蘭的分生苗生產流程包括：無菌培植體建立、根莖增殖與葉芽誘導、葉芽苗生長與增殖、葉芽苗發根，以及出瓶馴化等階段，若能夠在組培苗繁殖與種苗培育階段配合檢測特定病毒，將可以達到生產無特定病毒優質種苗的目標。首先是在分生苗繁殖前應該

就培植體來源的親本株進行病毒檢測，確定無病毒感染後才能夠進入組織培養程序，此種程序現已成為蘭花產業普遍的種苗生產方式。組培苗繁殖各階段的培植體也須進行檢測，確定未遭受病毒污染後才能繼續量化增殖；而在種苗繁殖栽培過程中也須適時進行檢測，因此檢測點應訂在當培植體或種苗數量在每次需要放大前進行檢測。

舉例來說，在親本株與組培苗繁殖階段因樣品數較少建議選用高檢出率的病毒檢測法，然而當種苗數量已累積相當數量，此時只能選擇高時效的檢測技術，才能有效處理為數眾多的樣品；因此，親本蘭株與組培品可先以ELISA法刪除已遭感染的植株或培植體，若是ELISA法檢測判讀為「無特定病毒植株」，則須再利用RT-PCR檢測進行確認，但種苗繁殖階段因數量較龐大，可先利用ELISA法

取樣檢測，在判讀為「無特定病毒植株」樣品中再逢機取樣以RT-PCR法進行確認。

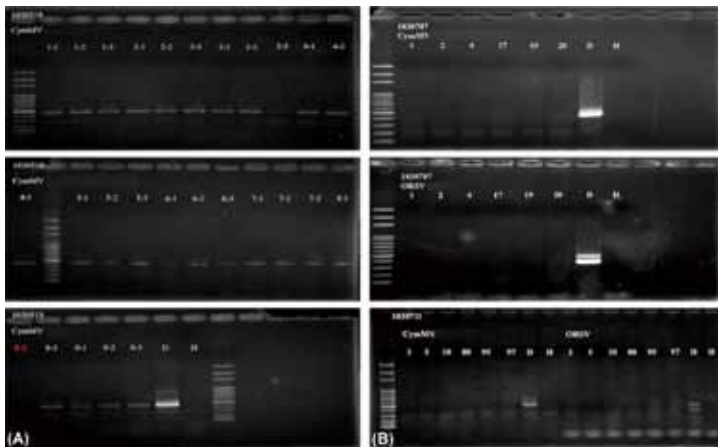
本研究在玉華四季蘭根莖增殖量化前，尚在生長階段的9支蘭花瓶取樣進行病毒檢測，每瓶取樣3個位置的根莖進行ELISA法檢測，結果皆未檢出CymMV感染，後續再以RT-PCR法檢測的結果卻僅有1個樣品(8-2，圖二A)



圖一、玉華四季蘭組織培養實生苗與分生苗繁殖體系作業時程概圖。

* (若瓶苗高度不一致時，需依其大小分別培養於含有不同組成分的培養基。)

未檢出病毒。顯示在此階段若僅以ELISA法檢測會有漏檢的風險，建議在進入根莖增殖階段前須利用RT-PCR法進行確認。另外一個檢測點是在組培苗出瓶馴化時進行病毒檢測，在約600苗的組培苗中取樣100苗以ELISA法進行病毒檢測，結果顯示並未檢出CymMV病毒，而後再抽樣12苗利用RT-PCR法再次檢測，結果仍顯示未檢出CymMV與ORSV病毒(圖二B)，顯示這批蘭苗可做為無特定病毒種苗繁殖親本源。上述蘭苗栽培於本所生



圖二、玉華四季蘭組織培養根莖(A)與溫室生長3年植株(B)，利用RT-PCR法檢驗特定病毒(CymMV與ORSV)之檢驗結果。



圖三、玉華四季蘭組培分生苗，於溫室生長3年經RT-PCR檢驗無感染特定病毒(CymMV與ORSV)植株之生長情形。

技組的隔離溫室中，在2年栽培期間每年抽樣進行RT-PCR檢測，結果均維持無特定病毒反應，證明此一無特定病毒種苗生產之可行性(圖三)。

藉由上述試驗結果，初步擬定小花蕙蘭無特定病毒優質種苗量產體系流程之重要管控要件包括：特定病毒檢測技術、檢測點、檢測法及取樣技術(表一、表二、圖四)。舉例而言，在組織培養之葉芽增殖階段，可取樣10%瓶苗、每瓶取樣20%葉芽苗(約3-5株)、每株取約0.2克

組織利用ELISA法檢測，若未檢出特定病毒再以RT-PCR法抽樣檢測；而後可依編號進行葉芽苗發根與健化培養。後續種苗生長繁殖階段，則是在每年的分株時進行取樣檢測，依種苗數量逢機取樣5-10%種苗，每株種苗取約0.2克成熟葉片，此階段利用ELISA法進行檢測即可。

本研究也將此分生苗繁殖與病毒檢測技術應用於寶島仙女四季蘭與富山奇蝶四季蘭的種苗繁殖系統，在組培苗出瓶栽培後之第1年與第2年以ELISA法與RT-PCR法檢測結果顯示，受測的60苗寶島仙女四季蘭與100苗富山奇蝶四季蘭均未檢出特定病毒，可作為優質種苗量產繁殖的親本株來源(圖五)。

五、結語

病毒病在蘭科植物上往往造成非常嚴重的損失，然而一些栽培年代久遠的小花蕙蘭品種，若植株沒有病徵仍可在國蘭市場上流通交易，但本研究抽樣進行病毒檢測的結果顯示，約有6成左右的植株被檢出感染病毒，而這些蘭株因為栽培管理良好使得病徵不易顯現，但是對於其後續生長與開花均會產生不良影響。本研究已建立特定病毒的檢測模式，並且獲得玉華、寶島仙女及富山奇蝶四季蘭等三種無感染(CymMV與ORSV)病毒之小花蕙蘭健康種苗，期能依此模式建立其他品種之無特定病毒優質種苗親本源。未來若能將上述技術純熟應用且配合貿易商與蘭農觀點，選擇適合商業栽培品種，利用組織培養技術量產優

表一、小花蕙蘭分生組培苗繁殖體系病毒檢定之檢測點與檢測方法

| 生育階段 | 檢測方法 | 取樣比例 |
|--------|----------------|--------|
| 親本蘭株 | ELISA / RT-PCR | 100% |
| 根莖增殖階段 | ELISA / RT-PCR | 100% |
| 葉芽增殖階段 | ELISA / RT-PCR | 10、20% |
| 出瓶組培種苗 | ELISA / RT-PCR | 10、20% |
| 2年生種苗 | ELISA | 5-10% |
| 3年生種苗 | ELISA | 5-10% |

備註：執行小花蕙蘭農場之健康管理，以維持優良無特定病毒種苗，取樣方法參見表二。

表二、小花蕙蘭分生組培苗繁殖體系病毒檢測之取樣方法

| 生育階段 | 取樣部位 |
|-------|--|
| 親本蘭株 | 基部鞘葉(sheath leaf)、根部 |
| 根 莖 | 根莖增殖前期，每瓶取樣3點；每條根莖取約0.2克；取樣之根莖進行編號，並分別繼代培養。 |
| 葉 芽 苗 | 芽體生長後期，逢機取10-20%；每瓶取5株葉芽苗(約20%)；每株取約0.2克葉片；依瓶苗編號進行葉芽苗發根培養。 |
| 種 苗 | 逢機取10%種苗；每株取約0.2克成熟葉片。 |

質種苗，配合無特定病毒檢測技術，並採用防雨設施生產高品質的外銷蘭株，將可提昇台灣小花蕙蘭產業的競爭力。

六、參考文獻

- Duff, J. and A. Daly, 2002. Orchid disease in the northern Territory. Agnote, 568: 1-5. ([https://transact.nt.gov.au/ebiz/dbird/TechPublications.nsf/E32B337711518CD369256EFE004F63B8/\\$file/568.pdf](https://transact.nt.gov.au/ebiz/dbird/TechPublications.nsf/E32B337711518CD369256EFE004F63B8/$file/568.pdf))
- 邱燕欣、陳威臣、陳金枝。2011。蕙蘭健康種苗特定病毒檢測管控體系之建立。第41-50頁。2011花卉研究成果發表會專刊(張耿衡、謝廷芳主編)，農業試驗所，台中。
- 袁雅芬、陳金枝、張清安。2010。種苗病毒發生、檢定及防治。第25-41頁。
- 張正、陳威臣。2010。國蘭種苗繁殖。第42-54頁。國蘭生產作業手冊(洪惠娟、魏芳明、張致盛主編)，台中區農業改良場，彰化。
- 張清安。2007。蘭花種苗病毒檢測與相關產業發展趨勢。農業生技產業季刊9: 42-48。
- 陳金枝、林家佑、鄭櫻慧、江芬蘭。2010。齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*)在四季蘭植株上之分佈差異與病毒檢測應用。植保會刊52: 17-24。
- 陳威臣、夏奇鈺、曹進

義。2015。小花蕙蘭利用無菌播種建立種苗繁殖技術簡介。農業試驗所技術服務季刊 101：4-9。

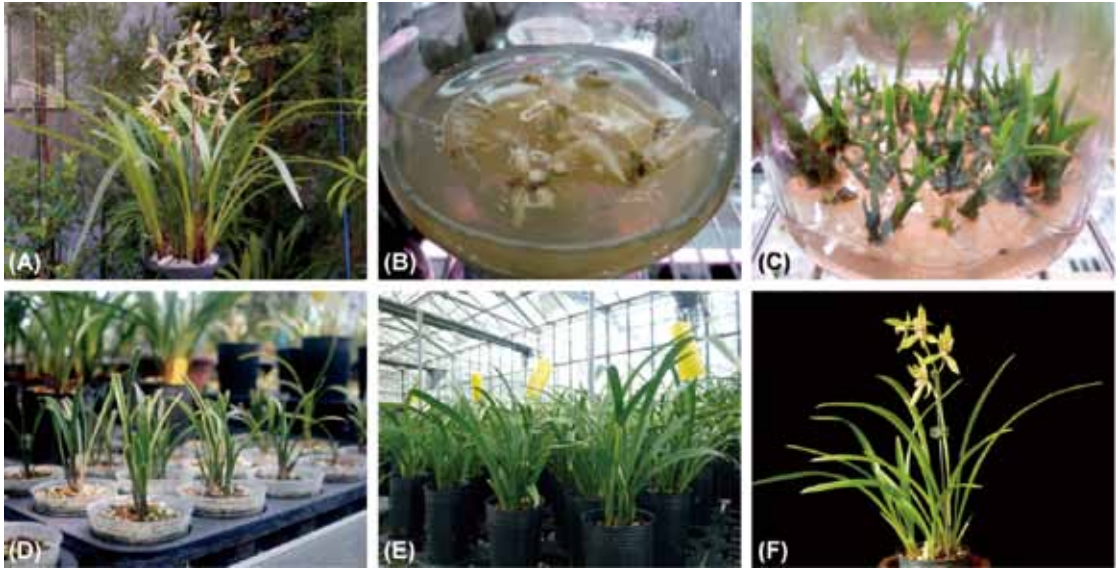
陳威臣、黃晉興、林毓雯、陳季呈、陳金枝、石信德、曹進義、夏奇鈺、謝廷芳。2011。高品質小花蕙蘭生產體系建構之研究。第71-87頁。2010花卉研究團隊研究現況與展望專刊(汪澤宏、謝廷芳主編)，農業試驗所，台中。

陳威臣、黃晉興、謝廷芳、陳金枝。2016。建構小花蕙蘭優質種苗與外銷

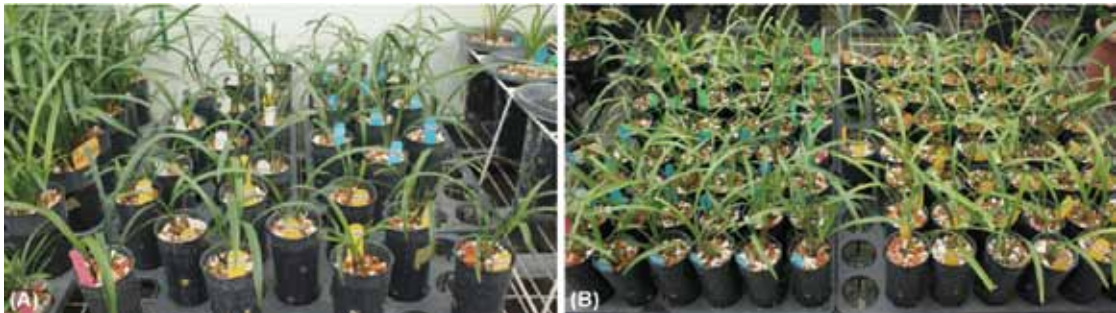
蘭株供應體系(上)。農業試驗所技術服務季刊 105：5-9。

陳威臣、黃晉興、謝廷芳、陳金枝。2016。建構小花蕙蘭優質種苗與外銷蘭株供應體系(下)。農業試驗所技術服務季刊 106：1-6。

謝廷芳、黃晉興、陳金枝。2010。第三章田間管理作業 第四節- 病害診斷與防治技術。第66-87頁。國蘭生產作業手冊(洪惠娟、魏芳明、張致盛主編)，台中區農業改良場，彰化。



圖四、玉華四季蘭無特定病毒分生苗繁殖系統之檢測點材料與蘭株生長情形。(A) 親本蘭株、(B) 根莖增殖、(C) 葉芽生長、(D) 出瓶苗、(E) 2年生苗及(F) 3年生開花株。



圖五、寶島仙女四季蘭(A)與富山奇蝶四季蘭(B)組培分生苗，於溫室生長2年經RT-PCR檢測無感染特定病毒(CymMV與ORSV)之植株生長情形。