

## 利用不同培植體配合利巴韋林處理對蝴蝶蘭去病毒之影響

夏奇鈺<sup>1</sup> 陳金枝<sup>2</sup> 林南欣<sup>3</sup> 蔡嫻婷<sup>4,\*</sup>

### 摘要

夏奇鈺、陳金枝、林南欣、蔡嫻婷。2017。利用不同培植體配合利巴韋林處理對蝴蝶蘭去病毒之影響。台灣農業研究 66(2):146–157。

本研究利用切取自短縮莖及擬原球體 (protocorm-like body; PLB) 之薄片培植體配合利巴韋林 (ribavirin) 不同濃度與處理時間進行蝴蝶蘭去病毒研究。試驗材料為確知感染蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*; CymMV) 之蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」組織培養瓶苗，以瓶苗去葉後之短縮莖切取厚約 1 mm 薄片作為培植體，將薄片培植體置入含有不同濃度 ribavirin 之液體培養基中震盪培養 1–5 d 後，移至不含 ribavirin 之固體培養基中培養；或將薄片培植體於含有較低濃度 ribavirin 之固體培養基中持續培養一代或二代，培養期間除調查培植體的存活率外，當長出之小芽其葉片或根長度達 1 cm 以上時，切取其葉片或根以間接式酵素連結免疫吸附反應法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; Indirect-ELISA) 進行病毒檢測，其中 ELISA 檢測呈陰性反應之芽體續以反轉錄核酸聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 進行檢測。試驗結果顯示，以 250 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 液體培養 1 d 以上即明顯降低培植體之成活率；ribavirin 濃度降至 25–75 mg L<sup>-1</sup> 之間處理 1–5 d，則不具去病毒之效果；但若於 50 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 液體培養基中浸泡 2 d 後，再繼代於含有 25 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 之固體培養基中繼續 8–12 wk 培養，去病毒率為 26.7%。此外，切取自短縮莖與切取自 PLB 之薄片培植體於低濃度 (12.5–37.5 mg L<sup>-1</sup>) ribavirin 固體培養基中進行二階段培養，短縮莖與 PLB 培植體之去病毒率最高分別為 29.2% 及 22.2%，但 PLB 薄片培植體之對照組 (未施用 ribavirin) 去病毒率可高達 100%。綜合本研究之結果，建議採用具有高再生能力之培植體，以對植物細胞毒傷害較小但具抑制病毒增生之低濃度 ribavirin 配合繼代處理，具有提高去病毒之效果。

**關鍵詞：**蘭科植物、薄層細胞培養、擬原球體。

### 前言

蝴蝶蘭為台灣農業之旗艦產業，但蝴蝶蘭產業競爭激烈，近年來無病毒種苗已經成為國際間品質競爭之選項，但由於有些品種在幼苗期的病毒病徵表現不明顯，導致無法於第一時間發現並移除病株。此外，業界普遍採用之分生苗繁殖系統，在增殖的過程中若缺乏管控，也是導致種苗感染病毒的另一途徑。我國於 2006 年公告實施蝴蝶蘭種苗病毒驗證制度，

業界對種苗病毒之管控普遍有共識，亦即欲進行組織培養繁殖之蘭株必須先經過病毒檢測程序，在確定不帶病毒後方能大量繁殖。惟蝴蝶蘭長期採用無性繁殖，許多早期流通之優良品種，因為受到病毒感染而退出市場者不在少數。此外，對於一些作為育種親本之非商業品種，在長期栽培後一旦受到病毒感染，珍貴種原就此消失，影響蝴蝶蘭育種工作的進行，殊為可惜。上述之感染病毒株若能利用去病毒技術重新活化，應可增加產業之競爭力。

投稿日期：2016 年 8 月 15 日；接受日期：2016 年 9 月 23 日。

\* 通訊作者：wttsai65@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所花卉研究中心研究助理。台灣 雲林縣。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所花卉研究中心聘用副研究員。台灣 雲林縣。

感染蘭科植物之病毒眾多，包括蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*; CymMV)、齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*; ORSV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 及番椒黃化病毒 (*Capsicum chlorosis virus*; CaCV) 等 (Zheng *et al.* 2011)，其中又以 CymMV 與 ORSV 兩種病毒最為普遍，對產業造成的影響亦最為嚴重，此兩者亦為國際間共識需檢測之病毒種類。台灣的病毒檢測技術發展相當進步，常用之檢測技術包括酵素連結抗體免疫吸附檢測法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、反轉錄核酸聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 和生物晶片 (biochip) 等 (Chang 2006)。在應用上掌握已知病毒之種類並具備敏感專一的病原檢定方法，是去病毒工作進行的基礎，而如何利用高效率的繁殖系統配合適當之去病毒處理，則是提高去病毒效率的重要關鍵 (Milošević *et al.* 2012; Panattoni *et al.* 2013)。

常用之去病毒方法包括組織培養 (*in vitro*)、溫度處理 (thermotherapy)、化學藥劑處理 (chemotherapy)、冷凍處理 (cryotherapy) 以及上述方法的綜合處理 (Panattoni *et al.* 2013)。蘭科植物很早就被發現利用莖頂培養可以得到無病毒之種苗 (Morel 1960)，但取生長點需要較高的操作技巧，且生長點的培養效率偏低是其缺點 (Kang *et al.* 2011)。Jensen (1951) 則指出，單獨使用熱療法無法有效去除蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 植物的嵌紋病毒 (Mosaic virus)；冷凍去病毒處理目前仍以種原保存為主要目的，在產業應用的實例較少 (Wang & Valkonen 2012)；這些去病毒方法中以組織培養方法如生長點、莖頂、擬原球體 (protocorm-like body; PLB) 等配合去病毒藥劑利巴韋林 (1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; ribavirin，俗稱病毒唑) 處理最常被採用 (Albouy *et al.* 1988; Lim *et al.* 1993; Toussaint *et al.* 1993; Poter & Kuehnle 1997; Milošević *et al.* 2012; Chien *et al.* 2015)。

薄層 (片) 培養 (thin cell layer; TCL) 最

初是為研究細胞形態分化發展出之培養技術，在菸草、百合及菊花等模式植物已建立有完備之研究基礎 (Nhut *et al.* 2003)。此技術具有材料需求量少、繁殖速率快、繁殖效能高等優點，因此除了作為學術研究外，亦被廣泛應用於各種作物的微體繁殖。利用 TCL 方法於蝴蝶蘭繁殖的研究並不多見，Park *et al.* (2002) 以蝴蝶蘭花梗芽之幼葉作為薄片培植體誘導 PLB 產生，證實 TCL 技術亦適用於蝴蝶蘭的繁殖。Lim *et al.* (1993) 利用單莖雜交蘭 *Mokara Char Kuan 'Pink'* 莖頂 (0.1–1.0 mm) 培植體以及切取自芽體或 PLB 之薄片培植體配合 ribavirin 處理，比較兩種培植體之去病毒效果。結果顯示，只有較大之莖頂 (0.5 mm 以上) 培植體可以成活，但其再生植株仍受病毒感染，相反的，切取自芽體或 PLB 之薄片培植體配合 10 或 20 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 處理後，其 CymMV 之去病毒率可達 100%。

本研究以確認感染 CymMV 之蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」為材料，以切取自瓶苗短縮莖的薄片培植體配合去病毒藥劑 ribavirin 之使用，探討 ribavirin 使用濃度及其處理時間對去病毒效率之影響，並比較切取自短縮莖及 PLB 之薄片培植體培養於含有 ribavirin 之固態培養基中進行二階段處理對於去病毒效率之影響。

## 材料與方法

### 植物材料

選用確認感染 CymMV 之蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」(*Phalaenopsis Tariflor Pixie 'Tainung No.1 Pixie'*) 組培瓶苗，瓶苗約 3–4 片葉，將瓶苗去葉後取長約 1 cm 之短縮莖，切取厚度約 1 mm 之短縮莖薄片作為培植體。此外，將薄片培植體長出之 PLB 加以繁殖，取大小約 3 mm 之 PLB 橫切成兩半作為 PLB 薄片培植體。

### 培養基配製及培養環境

薄片培植體之培養基共 2 種，培養基 A 成分為 1/2 MS (Murashige & Skoog 1962) 基礎鹽類添加 2 mg L<sup>-1</sup> 腺嘌呤 (adenine)、1 g L<sup>-1</sup> 蛋白胨 (peptone)、100 mL L<sup>-1</sup> 椰子水、20 g L<sup>-1</sup> 蔗糖，固體培養基另添加 3 g L<sup>-1</sup> 水晶洋菜。

培養基 B 除上述成分外另添加  $1 \text{ mg L}^{-1}$  6- 苯基腺嘌呤 (N6-benzyladenine; BA) 及  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  萘乙酸 (1-naphthaleneacetic acid; NAA)，固體培養基則另行添加  $6 \text{ g L}^{-1}$  洋菜 (惠光公司，台灣)。培養基於滅菌前將 pH 值調整為 5.7，以殺菌釜於  $121^\circ\text{C}$  ( $1.1 \text{ kg cm}^{-2}$ ) 滅菌 25 min。滅菌後之培養基於凝固前分裝至直徑 6 cm 及 9 cm 無菌塑膠培養皿，分別裝入 12.5 mL 及 25 mL 之培養基。ribavirin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) 母液以  $0.22 \mu\text{m}$  微孔濾膜過濾除菌，再依所需濃度取適量加入滅菌後之液體培養基或未凝固之固態培養基，搖勻後分裝。培植體接種後於  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、光週期為 14 h、光強度為  $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  環境中培養。

#### 高濃度 ribavirin 浸泡天數處理

將短縮莖薄片培植體置於含  $250 \text{ mg L}^{-1}$  ribavirin 之液體增殖培養基 B 中，於黑暗下以 100 rpm 水平式震盪培養 1、2 及 4 d 後，以無菌水清洗，將薄片培植體移植至固體增殖培

養基 B，置於光照環境下培養。對照組為未經 ribavirin 處理之薄片，直接將薄片培植體接種於固體培養基 B 上，於光照環境下培養。每個直徑 6 cm 之培養皿置放切取自 1 個短縮莖之薄片培植體 (約 6–8 片)，每處理使用 7 個短縮莖，培養 4 wk 與 8 wk 後調查培植體之存活率。存活培植體之定義如圖 1 所示，培植體上長出之各種芽體 (圖 1A–D)、PLB (圖 1E–F)、癒傷組織 (圖 1G–H)，或是培植體無再生情形但亦未褐化者 (圖 1I)，以上情形皆視為存活；培植體已褐化或是白化且無任何再生情形者 (圖 1J–L) 則視為未存活。培植體存活率以存活之薄片培植體數除以原始培養之薄片培植體總數之百分比表示。

#### Ribavirin 濃度配合浸泡天數處理

將短縮莖薄片培植體分別置於含有 25、50 及  $75 \text{ mg L}^{-1}$  ribavirin 之液體培養基 A 中，於黑暗下以 75 rpm 水平震盪培養 1、2 及 5 d 後，繼代至不含 ribavirin 固體之培養基 A 中

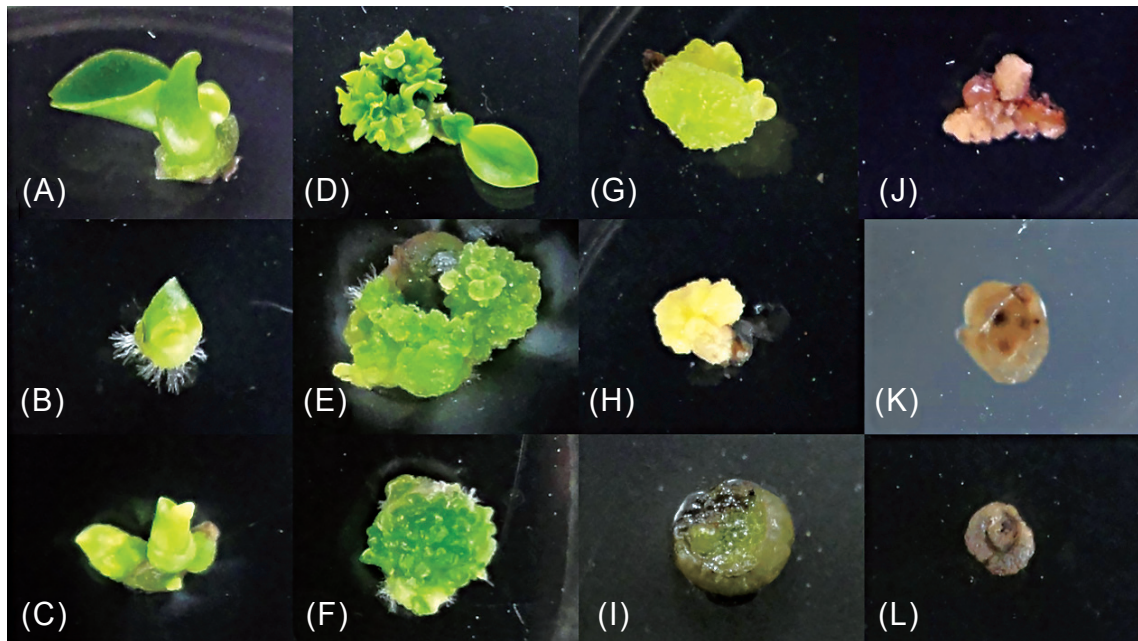


圖 1. 存活及未存活培植體之樣態。芽體 (A–D)、擬原球體 (E–F)、癒傷組織者 (G–H)，無再生情形但亦未褐化者 (I) 皆視為存活；已褐化、白化且無任何再生情形者 (J–L) 則視為未存活。

**Fig. 1.** Identification of survival and non-survival explants. Explants with regenerated shoot (A–D), protocorm-like body (E–F), callus (G–H) or explants remaining greenish without any type of regeneration were all counted as survival explants. Browning or whitening explants without regeneration (J–L) were counted as non-survival explants.

之後，置於光照環境下培養。對照組為未經 ribavirin 處理之薄片培植體，直接接種於不含 ribavirin 之固體 A 培養基，於光照環境下培養。每一直徑 6 cm 之培養皿中置放切取自 1 個短縮莖之薄片培植體 (約 6–8 片)，每一個處理共使用 15 個短縮莖，培養 4 wk 及 8 wk 後調查培植體之存活率，存活培植體之定義及計算方式同上述。

### Ribavirin 浸泡後接種於降低濃度 ribavirin 固態培養處理

將短縮莖薄片培植體置於含 50 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 液體培養基 A 中，於黑暗下以 75 rpm 水平震盪培養處理 2 d 後取出，將培植體分別繼代至分別含有 0、12.5 及 25 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 之固體培養基 A 中，於光照環境下培養。每一直徑 9 cm 之培養皿中置放切取自 3 個短縮莖之薄片培植體，每一個處理共使用 15 個短縮莖，培養 4、8 及 12 wk 後調查培植體之存活率，存活培植體之定義及計算方式同上述。

### 不同來源培植體於含有不同濃度 ribavirin 之固態培養基中進行二階段處理

切取自短縮莖及 PLB 之薄片培植體第一階段培養於含有 12.5、25.0 或 37.5 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 之固體培養基 A 中，培養 8 wk 後將同一濃度處理其中一半之培植體繼代至不含 ribavirin 之培養基中培養，將另一半之培植體繼代至含有 12.5 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 之培養基中培養。對照組為培植體持續培養於不含 ribavirin 之固體培養基 A 中。直徑 6 cm 之培養皿置放切取自 3 個短縮莖之薄片培植體，每處理接種 8 皿共使用 24 芽；或每皿置放切取自 4 個 PLB，每個 PLB 切成 2 片之薄片培植體，每處理接種 9 皿共使用 36 個 PLB。

### 病毒檢測分析

因培植體在 ribavirin 不同濃度及不同處理時間後，其上長出各種芽體 (圖 1) 所需之時間並不相同，因此病毒檢測之取樣時間以芽體發育至帶有 1 片 1 cm 以上長度之葉片或根時進行，切取 1 cm × 1 cm 之葉片，或 1 cm 長度之根 (鮮重 50 mg 以上) 做為病毒檢測樣品，

先以 ELISA 法進行病毒檢測，ELISA 呈現陰性反應之檢測樣品進一步以 RT-PCR 法進行病毒檢測，兩種方法皆未檢測出 CymMV 病毒者視為無病毒植株，去病毒率以 RT-PCR 未檢出之芽體數除以各處理原始使用芽體數之百分比表示。

**酵素連結免疫吸附反應：**本研究採用 indirect ELISA 法進行 CymMV 及 ORSV 之檢測 (Chang *et al.* 1988; Chen *et al.* 2013)。反應步驟如下：(1) 罹病組織覆膜反應：取新鮮葉片 0.1 g 磨碎，加入 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 混合，取組織液添加於 96 孔 ELISA 反應盤中 (100 μL 孔<sup>-1</sup>)，每樣品 2 個重複，置於 37°C 生長箱 4 h (或 4°C 隔夜)；然後以 1× PBST (137 mM NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.05% Tween 20) 沖洗 3 次；(2) 與受測病毒之抗體反應：分別以自製 (Chen *et al.* 2010) 之 CymMV 及 ORSV 抗體的免疫球蛋白 (IgG) 之 1,000× 稀釋反應液，添加於各反應孔中 (100 μL 孔<sup>-1</sup>)，於 25°C 定溫反應 3–4 h (或 4°C 隔夜)，之後以 1× PBST 沖洗 3 次；(3) 與二次抗體反應：加入已稀釋 6,000× 之鹼性磷酸酶酵素連結山羊抗兔 IgG (AP-conjugate goat anti-rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, USA) 於各反應孔中 (100 μL 孔<sup>-1</sup>)，置於 25°C 之定溫箱反應 3–4 h；再以 1× PBST 沖洗液沖洗 3 次；(4) 呈色反應：加入濃度為 1 mg mL<sup>-1</sup> 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-Nitrophenyl phosphate; p-NPP) (Amresco, Solon Ind., Ohio, USA)，150 μL 孔<sup>-1</sup>，反應 30–40 min，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值。樣品吸光值高於健康葉片吸光值兩倍者，判讀為病毒正反應。

**反轉錄-聚合酶鏈鎖反應：**本試驗進行步驟如下：(1) 罹病植物組織全量核酸之純化-本試驗依據商業化植物核酸微量萃取試劑組 (Plant Total RNA mini Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corporation, Taipei, Taiwan) 之步驟進行供試植物全量核糖核酸 (ribonucleic acid; RNA) 之萃取；(2) 以植物全量 RNA 為模版，利用

CymMV-163u/CymMV-589d 和 ORSV-229u/ORSV-449d 引子對分別於個別之反應管中進行 CymMV 及 ORSV 之 RT-PCR 反應，預估可獲得病毒核酸片段大小分別為 CymMV 427 bp，以及 ORSV 221 bp 之增幅產物。RT-PCR 以商業化單步驟 RT-PCR 試劑組 (GeneMark Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 進行反應，於總體積為 25  $\mu\text{L}$  之反應管中混合下列成分：1  $\mu\text{L}$  RNA、5  $\mu\text{L}$  之 5 $\times$  RT Reaction Mix、5  $\mu\text{L}$  之 5 $\times$  Enhancer、0.5  $\mu\text{L}$  之 RT Enzyme mix、0.1  $\mu\text{L}$  RNase Block、11.4  $\mu\text{L}$  之 Nuclease free water、10  $\mu\text{M}$  之受測病毒引子各 1  $\mu\text{L}$ ，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Germany) 中進行。反應條件為 50 $^{\circ}\text{C}$  下進行反轉錄反應 30 min，再以 94 $^{\circ}\text{C}$  下變性 2 min，所獲得之反轉錄核酸繼續進行 PCR 反應，條件為 94 $^{\circ}\text{C}$  下變性 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$  下煉合 15 s，72 $^{\circ}\text{C}$  下聚合 30 s 為一循環，共進行 30 個循環，最後一個步驟以 72 $^{\circ}\text{C}$  聚合 4 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析。

## 結果

### 高濃度 ribavirin 浸泡天數處理

切取自蝴蝶蘭短縮莖之薄片培植體於含有 250  $\text{mg L}^{-1}$  ribavirin 之液體培養基中震盪培養

1、2 及 4 d 後，繼代至不含 ribavirin 之固態培養基中培養，薄片培植體在 4 wk 及 8 wk 培養後之培植體存活率如表 1 所示。未經 ribavirin 處理之對照組 (0 d) 培植體在培養 4 wk 與 8 wk 後之存活率變化不大，皆在 81% 以上。但處理組之培植體隨著 ribavirin 處理天數增加至 2 及 4 d 時，存活率隨之下降，且觀察培植體 8 wk 之存活率較 4 wk 為低，顯示 ribavirin 雖然短時間 (1–4 d) 處理，但對培植體後續的生長仍具有不良影響。Ribavirin 處理 2 d 之培植體在培養 8 wk 時其存活率不及對照組之一半；處理 4 d 之培植體，在培養 4 wk 後已大部分呈現褐化現象，存活率僅 3.6%，但在 8 wk 培養後有少數褐化之培植體上分化出癒傷組織，因此存活率略提高至 5.4%。對照組處理獲得之總芽數為 52 芽，ribavirin 1 d 處理組獲得總芽數為 66 芽，顯示 ribavirin 1 d 處理並未造成芽數之減少；但延長處理天數至 2 與 4 d，兩處理組之芽數降低為 33 芽與 4 芽。病毒檢測的結果顯示，只有 ribavirin 2 d 處理組在 33 個芽體中有 5 個芽體呈 ELISA 陰性反應外，其他所有處理之芽體全數為 CymMV 正反應。此外，從 ribavirin 各處理之 ELISA 平均檢測值來看，ribavirin 1、2 及 4 d 處理 CymMV 之 ELISA 檢測值分別為 2.99–3.07，對照組則為 3.21。ELISA 檢測呈現陰性反應之 5 個芽體繼續以 RT-PCR 方法檢測，結果皆呈現 CymMV 病毒正反應。

表 1. Ribavirin 250  $\text{mg L}^{-1}$  處理不同天數對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」短縮莖薄片培植體之存活率及去病毒率之影響。

Table 1. Effects of 250  $\text{mg L}^{-1}$  ribavirin with various incubation days on thin stem section explant survival and virus elimination of *Phalaenopsis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie'.

Treatment (d)	Explant survival (%)		Virus undetectable (%)	ELISA detection	
	4 wk	8 wk		CymMV OD value <sup>y</sup>	
				+	-
0	84.4 $\pm$ 10.3 a <sup>z</sup>	81.3 $\pm$ 8.7 a	0.0 (0/52)	3.21 $\pm$ 0.24 (52) <sup>x</sup>	-- (0)
1	78.1 $\pm$ 16.0 a	63.8 $\pm$ 18.5 b	0.0 (0/66)	2.99 $\pm$ 0.29 (66)	-- (0)
2	57.3 $\pm$ 24.1 b	37.9 $\pm$ 18.1 c	15.2 (5/33)	3.07 $\pm$ 0.36 (28)	0.04 $\pm$ 0.02 (5)
4	3.6 $\pm$ 6.1 c	5.4 $\pm$ 9.8 d	0.0 (0/4)	3.07 $\pm$ 0.24 (4)	-- (0)

<sup>z</sup> Means within a column followed by different letter(s) are significantly different at  $P \leq 0.05$ .

<sup>y</sup> OD value twice larger than that of healthy plant is defined as virus detectable (+), OD value other than that is defined as undetectable (-).

<sup>x</sup> Value in parentheses represents number of tested samples.

### Ribavirin 濃度配合浸泡天數處理

因為 250 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 濃度對培植體的生長有較大的抑制作用，導致存活率偏低 (表 1)，遂降低 ribavirin 濃度至 25、50 及 75 mg L<sup>-1</sup> 配合不同浸泡天數進行處理，薄片培植體之存活率及病毒檢測結果如表 2 所示。在培養 4–8 wk 間，除了低濃度 25 mg L<sup>-1</sup> 不同浸泡天數間 (1、2 或 5 d) 之存活率差異較小外，提高濃度至 50 mg L<sup>-1</sup> 處理 5 d 者或 75 mg L<sup>-1</sup> 處理 2 及 5 d 者，其 8 wk 培植體之存活率皆顯著降低，顯示 ribavirin 濃度與處理時間兩者對培植體之存活率有交互之影響。病毒檢測結果顯示，對照組與 ribavirin 各處理組總共 95 芽，經 ELISA 檢測皆呈 CymMV 正反應，且各處理 CymMV 之 ELISA 平均檢測值與對照組相較，並未呈現下降之趨勢。

### Ribavirin 浸泡後接種於降低濃度 ribavirin 固態培養處理

上述試驗顯示將 ribavirin 濃度降低至 25–75 mg L<sup>-1</sup> 配合短時間 1–5 d 之浸泡處理，並未能達到去病毒之效果，本試驗將切取自短縮莖之薄片培植體以 50 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 處

理 2 d 後，繼代至不含 ribavirin 或分別含有 12.5、25.0 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 之固體培養基中持續培養，薄片培植體的成活率及 ELISA 檢測結果如表 3 所示。薄片培植體在添加 12.5 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 培養基中之存活率與對照組比較並無明顯差異，但繼代至含 25.0 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 12 wk 後之培植體其存活率則較對照組為低。病毒檢測的結果顯示，對照組檢測之 90 個芽體全數為 CymMV 正反應，而繼代至含有 12.5 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 固體培養基中持續培養者，其芽體經 ELISA 檢測，其病毒未檢出率為 30.4% (7/23)，但將 7 個 ELISA 未檢出病毒之樣品續以 RT-PCR 檢測，則皆呈現病毒正反應；繼代於含有 25.0 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 中持續培養獲得之芽體，其 ELISA 病毒未檢出率為 20.7% (19/92)，將 19 芽續以 RT-PCR 檢測，其中有 4 芽為負反應，以 RT-PCR 未檢出之芽體數除以處理原始使用之芽體數，計算出去病毒率為 26.7% (4/15)。經 RT-PCR 確認之無病毒株，出瓶後於溫室種植可正常開花 (圖 2A)，取植株之花苞、花瓣、花梗、下位葉片及根尖等部位組織進行 RT-PCR 檢測，結果皆為 CymMV 病毒負反應 (圖 2B)。

表 2. Ribavirin 濃度及處理天數對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」短縮莖薄片培植體之存活率及去病毒率之影響。

Table 2. Effects of ribavirin concentration in combination with incubation days on thin stem section explant survival and virus elimination of *Phalaenopsis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie'.

Ribavirin (mg L <sup>-1</sup> )	Treatment (d)	Explant survival (%)		ELISA detection	
		4 wk	8 wk	Virus undetectable (%)	CymMV OD value <sup>y</sup>
					+
0	0	56.0 ± 21.0 a <sup>z</sup>	29.5 ± 16.4 a	0.0 (0/30)	3.09 ± 0.21 (30) <sup>x</sup>
	1	36.3 ± 14.3 b	22.1 ± 12.6 ab	0.0 (0/8)	3.09 ± 0.16 (8)
25	2	46.0 ± 21.1 ab	22.8 ± 14.8 a	0.0 (0/18)	3.12 ± 0.25 (18)
	5	50.3 ± 22.2 ab	23.4 ± 16.8 a	0.0 (0/5)	3.29 ± 0.07 (5)
50	1	49.8 ± 21.3 ab	29.4 ± 14.9 a	0.0 (0/7)	3.32 ± 0.12 (7)
	2	41.9 ± 19.7 ab	23.9 ± 12.8 a	0.0 (0/6)	3.36 ± 0.08 (6)
75	5	22.0 ± 15.6 c	8.6 ± 9.0 c	0.0 (0/1)	3.26 ± 0.00 (1)
	1	54.2 ± 22.3 a	26.3 ± 13.4 a	0.0 (0/14)	3.06 ± 0.23 (14)
75	2	43.5 ± 21.2 ab	13.4 ± 10.8 bc	0.0 (0/5)	3.29 ± 0.07 (5)
	5	15.5 ± 12.5 c	11.5 ± 9.8 c	0.0 (0/1)	3.03 ± 0.00 (1)

<sup>z</sup> Means within a column followed by different letter(s) are significantly different at  $P \leq 0.05$ .

<sup>y</sup> OD value twice larger than that of healthy plant is defined as virus detectable (+).

<sup>x</sup> Value in parentheses represents number of tested samples.

表 3. 固態培養基中之 ribavirin 濃度對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」薄片培植體之存活率及去病毒率之影響。

**Table 3.** Effects of ribavirin concentration in solid culture medium on thin stem section explant survival and virus elimination of *Phalaenopsis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie'<sup>z</sup>.

Ribavirin (mg L <sup>-1</sup> )	Explant survival (%)			ELISA detection			RT-PCR undetectable (%)	Virus elimination (%)
	4 wk	8 wk	12 wk	Virus undetectable (%)	CymMV OD value <sup>x</sup>			
					+	-		
0	48.8 ± 18.9 a <sup>y</sup>	33.8 ± 18.0 a	27.5 ± 17.6 a	0.0 (0/90)	3.22 ± 0.19 (90) <sup>w</sup>	-- (0)	-- (0)	-- (0)
12.5	39.3 ± 15.1 ab	29.3 ± 13.2 a	23.9 ± 16.4 ab	30.4 (7/23)	2.39 ± 0.90 (16)	0.25 ± 0.17 (7)	0 (0/7)	0.0 (0/15)
25.0	34.3 ± 14.7 b	23.9 ± 10.7 a	13.9 ± 12.7 b	20.7 (19/92)	3.09 ± 0.35 (73)	0.21 ± 0.18 (19)	21.1 (4/19)	26.7 (4/15)

<sup>z</sup> Explants were soaked in liquid medium containing 50 mg L<sup>-1</sup> ribavirin for 2 days before subculture into the solid medium containing 0–25 mg L<sup>-1</sup> ribavirin.

<sup>y</sup> Means within a column followed by different letter(s) are significantly different at  $P \leq 0.05$ .

<sup>x</sup> OD value twice larger than that of healthy plant is defined as virus detectable (+), OD value other than that is defined as undetectable (-).

<sup>w</sup> Value in parentheses represents number of tested samples.

### 不同來源培植體於含有不同濃度 ribavirin 固態培養基中進行二階段處理

將切取自短縮莖之薄片培植體或切取自 PLB 之薄片培植體，直接接種於含有 12.5、25.0 或 37.5 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 固態培養基中培養，8 wk 後將同一處理之培植體其中一半繼代至不含 ribavirin 培養基中培養，另一半則繼代於含有 12.5 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 培養基中培養。切取自短縮莖之薄片培植體長出之芽體先以 ELISA 檢測，反應為陰性之芽體續以 RT-PCR 檢測，結果如表 4 所示。從 ELISA 之 CymMV 未檢出率來看，所有處理的平均值在 11.4–56.7% 之間，CymMV 未檢出率最高者為 37.5/12.5 mg L<sup>-1</sup> (第一階段/第二階段濃度) 處理組之 56.7%，將未檢出之芽體以 RT-PCR 檢測加以確認，結果顯示 CymMV 未檢出率以第一階段培養基中含有較高濃度之 37.5/0 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 處理組之 43.8% 為最高，其次為 12.5/12.5 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 處理組之 25%。以 RT-PCR 未檢出芽體數除以處理原始使用之芽體數計算去病毒率，結果仍以 37.5/0 mg L<sup>-1</sup> 處理組之 29.2% 為最高，其次為對照組之 20.8%。

以 PLB 為培植體進行同上之試驗，結果如表 5 所示。CymMV 之未檢出率在 32.3–62.2% 之間，將 ELISA 未檢出之芽體續以 RT-PCR

檢測，未檢出率顯示以對照組之 46.9% 為最高，其次為 12.5/0 mg L<sup>-1</sup> 與 12.5/12.5 mg L<sup>-1</sup> 處理，分別為 41.7% 及 40%。以 RT-PCR 未檢出芽體數除以處理原始使用之芽體數計算去病毒率，仍以對照組去病毒率達 100% 最高，其次為 37.5/12.5 mg L<sup>-1</sup> 處理之 22.2%。

## 討論

Ribavirin 是一種合成的核苷酸類似物，在細胞內形成磷酸化能抑制病毒 RNA 合成並阻止病毒的複製，是廣泛被使用的去病毒藥劑，但 ribavirin 使用之濃度及處理時間會影響其去病毒效果的表現 (Panattoni *et al.* 2013)。本研究試驗初期採用高濃度 ribavirin 250 mg L<sup>-1</sup> 短時間 (1–4 d) 浸泡薄片培植體，雖然浸泡處理時間只有數天，但培植體之成活率受到很大之影響。250 mg L<sup>-1</sup> 浸泡處理 2 d 之薄片培植體其成活率僅為對照組之一半，處理 4 d 之薄片培植體的成活率僅剩 5.36%。由處理組 ELISA 檢測值及 RT-PCR 之結果來看，ribavirin 250 mg L<sup>-1</sup> 濃度短時間 (1–4 d) 處理並無明顯降低病毒之效果，但高濃度 ribavirin 對培植體細胞產生毒害作用，導致成活率降低，培植體的再生亦受到嚴重抑制，因此並不推薦。

將 ribavirin 浸泡濃度降至 25–75 mg L<sup>-1</sup> 雖可改善藥劑對培植體生長毒害的影響，但

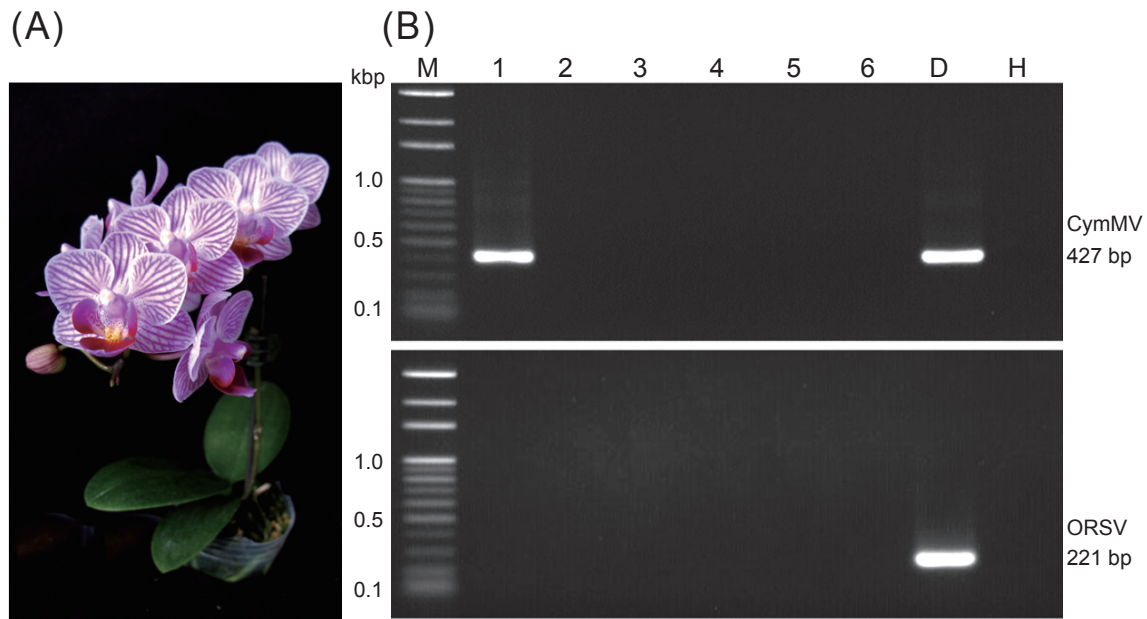


圖 2. 去病毒株開花情形 (A) 與利用 CymMV 及 ORSV 引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應中檢測蘭花小精靈帶病毒母株及其去病毒株各部位組織之病毒反應 (B)。行 M：核酸分子量標幟；行 1，原病毒株；行 2-6，去病毒之各部位組織 (行 2：花苞；行 3：花朵；行 4：花梗、行 5：葉片；行 6：根)；行 D：罹病蘭花組織對照；行 H：健康蘭花組織對照。病毒引子對包括 CymMV-163u/CymMV-589d 及 ORSV-229u/ORSV-449d，可增幅出之個別病毒的核酸片段，預估分別為 CymMV 427 bp 和 ORSV 221 bp。小精靈帶病毒母株乃單獨 CymMV 感染株。

**Fig. 2.** Flowering of virus-disinfected plant of *Phalaenopsis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie' (A) and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of virus-infected plant, or -disinfected tissues by the individual primers of CymMV and ORSV (B). Lane M: molecular marker; lane 1, the original CymMV-infected orchid; lane 2-6: CymMV-disinfected tissues from different parts of plant (lane 2: flower bud; lane 3: flower; lane 4: flower stalk; lane 5: leaf; and lane 6: roots); lane D: diseased orchid; and lane H: the healthy tissue of orchid. The predicted sizes of DNA fragments, amplified by the primer pairs CymMV-163u/CymMV-589d and ORSV-229u/ORSV-449d, were 427 bp for CymMV and 221 bp for ORSV, respectively. The CymMV-infected orchid stock was used in this study.

表 4. 連續固態培養基培養中之 ribavirin 濃度對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」短縮莖培植體之存活率及去病毒率之影響。

**Table 4.** Effects of ribavirin concentration in consecutive solid culture medium on virus elimination of *Phalaenopsis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie' using thin section explants derived from *in vitro* shoot stem.

Ribavirin (mg L <sup>-1</sup> )		ELISA undetectable (%)	RT-PCR undetectable (%)	Virus elimination (%)
0-8 wk	9-12 wk			
0	0	11.4 (5/44)	11.4 (5/44)	20.8 (5/24)
12.5	0	23.1 (3/13)	7.7 (1/13)	4.2 (1/24)
	12.5	41.7 (5/12)	25.0 (3/12)	12.5 (3/24)
25.0	0	6.7 (1/15)	0.0 (0/15)	0.0 (0/24)
	12.5	25.0 (4/16)	18.8 (3/16)	12.5 (3/24)
37.5	0	50.0 (8/16)	43.8 (7/16)	29.2 (7/24)
	12.5	56.7 (17/30)	13.3 (4/30)	16.7 (4/24)

表 5. 連續培養固態培養基中之 ribavirin 濃度對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」擬原球體 (protocorm-like body; PLB) 薄片培植體存活率及去病毒率之影響。

Table 5. Effects of ribavirin concentration in consecutive solid culture medium on virus elimination of *Phalaenopsis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie' using thin section explant derived from protocorm-like body (PLB).

Ribavirin (mg L <sup>-1</sup> )		ELISA undetectable (%)	RT-PCR undetectable (%)	Virus elimination (%)
0-8 wk	9-12 wk			
0	0	49.4 (40/81)	46.9 (38/81)	100 (38/36)
12.5	0	41.7 (5/12)	41.7 (5/12)	13.9 (5/36)
	12.5	60.0 (9/15)	40.0 (6/15)	16.7 (6/36)
25.0	0	37.5 (6/16)	18.8 (3/16)	8.3 (3/36)
	12.5	36.8 (7/19)	15.8 (3/19)	8.3 (3/36)
37.5	0	32.3 (10/31)	3.2 (1/31)	2.8 (1/36)
	12.5	62.2 (23/37)	21.6 (8/37)	22.2 (8/36)

3 種濃度在 1-5 d 的短時間處理下，各處理之 CymMV 檢測值並未下降 (表 2)，顯示 ribavirin 在這樣的濃度與時間之組合下，並未能有效抑制病毒的表現，且 ribavirin 濃度在 50 mg L<sup>-1</sup> 以上，延長處理時間至 5 d 時，仍然嚴重影響培植體的存活率 (表 2)。Toussaint *et al.* (1993) 以蕙蘭 (*Cymbidium*) 之 PLB 以 35 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 進行連續多代液態培養去病毒試驗，報告中指出這個濃度可有效抑制病毒，但不致於對培植體產生毒害作用。在本研究中短縮莖薄片培植體以 ribavirin 處理之結果 (表 2) 亦可看出 ribavirin 濃度以及處理時間對薄片培植體成活率之影響，但推測因為薄片培植體對 ribavirin 之耐受時間較完整之 PLB 為低，且 ribavirin 採用之濃度與處理時間跟培植體及培養型式 (固、液體) 皆有相關，因此去病毒之效果亦不同。利用高濃度 (250 mg L<sup>-1</sup>) 短時間浸泡嚴重影響培植體之生長，或降低濃度 (25-75 mg L<sup>-1</sup>) 短時間浸泡處理，兩者皆未能有效去除病毒，遂思考採用以不影響培植體再生之較低濃度 ribavirin 進行長時間共同培養，亦即在固態培養基中提供低濃度 ribavirin 與培植體長期共同培養探討去病毒的可行性。

短縮莖薄片培植體在 50 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 浸泡 2 d 處理後，持續繼代培養在含有 12.5 及 25 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 之固態培養基中，結果分別有 30.4% (7/23) 及 20.7% (19/92) 之再生芽體其 ELISA 檢測呈現陰性反應 (表 3)，且 25 mg L<sup>-1</sup> 處理 RT-PCR 未檢出率為 21.1% (4/19)，

表示薄片培植體在低濃度 ribavirin 中持續培養，CymMV 病毒量的表現會受到抑制 (表 3)。延續培植體於低濃度 ribavirin 中持續培養具有抑制病毒之概念，但針對含有 ribavirin 培養基持續培養所需的時間加以比較 (表 4)。試驗結果顯示，ribavirin 濃度較低者如 12.5 或 25 mg L<sup>-1</sup>，可延長培植體與 ribavirin 共培養時間，有利於提高去病毒率，但提高 ribavirin 濃度至 37.5 mg L<sup>-1</sup> 時，是否延長 ribavirin 之培養時間，在本試驗中之短縮莖薄片培植體與 PLB 薄片培植體表現並不一致。綜合言之，雖然低濃度 ribavirin 對細胞的毒害作用之影響較小，但培養基中之 ribavirin 仍對芽體的再生造成影響，推測長時間施以低濃度 ribavirin 處理，雖有助降低病毒濃度，但對新生組織的生長會有不利之影響，必須加以考慮。Lim *et al.* (1993) 將單莖性雜交蘭 (*Mokara* Char Kuar 'Pink') 之 PLB 培養於低濃度 ribavirin (10-20 mg L<sup>-1</sup>) 培養基中，經持續繼代亦能得到無病毒株。他並指出 ribavirin 藥劑的效果與其說是殺病毒 (virucidal) 不如說是抑制病毒 (virustatic)。本研究之結果與其論點相當吻合，因為短時間高濃度之 ribavirin 處理並無法穩定的去除病毒 (表 1 及 2)，反而是低濃度 ribavirin 持續培養有助於病毒量之降低 (表 3、4 及 5)，原因是 ribavirin 的存在主要在抑制病毒之增生而非殺死病毒，因此推測 ribavirin 使用之濃度只要能達到抑制病毒增生之門檻即可，提高 ribavirin 濃度必須考慮藥劑本身對植物細胞產生之毒對

培植體再生力的影響，進而影響到去病毒之效果。

去病毒效率受許多的因子的影響，如植物品種、病毒的種類、藥劑濃度與處理方式、培植體增殖率等 (Panattoni *et al.* 2013)。相同的去病毒方式使用在不同的繁殖系統中，去病毒的效果亦不同，主要原因在於若是病毒複製或移行速度不及細胞的分裂速度時，會有較多機會得到未受感染的再生芽體。從短縮莖切取而來之薄片培植體與切取自 PLB 之薄片培植體作比較，PLB 培植體因具有較高之再生率，有利於再生芽體逃避病毒的感染，這一點從短縮莖而來之培植體 (表 4) 與從 PLB 而來之培植體 (表 5) 在相同處理情況下，後者除 37.5/0 mg L<sup>-1</sup> 處理組外，各處理之 ELISA 檢出率皆較低。顯示培植體本身的再生率對於去病毒效率之影響，尤其 PLB 培植體試驗中，對照組高達 100% 去病毒率表現 (表 5)，具體證明若培植體具有高再生能力，ribavirin 處理並非絕對必須。Li (2011) 研究指出以確認病毒感染之 PLB 進行增殖，發現 PLB 增殖團中感染 CymMV 病毒的比率為 78.04%，亦即由一顆 PLB 增殖出來之 PLB 增殖團塊，有 21.96% 的新生 PLB 尚未受到感染。晚近 Chien *et al.* (2015) 利用莖頂誘導而來之 PLB 作為去病毒材料，在繁殖的過程未使用任何去病毒藥劑處理，在 PLB 第 1 次繼代後即可獲得高達 68.75% (2/32) 之無病毒 PLB，也呼應了這樣的看法。Albouy *et al.* (1988) 將蕙蘭屬植物 (*Cymbidium*) 之 PLB 培養於含有 25 mg L<sup>-1</sup> ribavirin 培養基中經過多次繼代，指出以較短的繼代時間 (18 d vs. 30 d) 更能提高去病毒效率，亦即將處於高繁殖狀態之新生 PLB 迅速與舊組織脫離，以 18 d 繼代一次之速率經 5 次繼代後，即有 95% 之新生 PLB 為 virus-free 植株。蘭科植物的繁殖系統會影響去病毒處理的效率，除了培植體再生能力的影響外，培植體的大小亦會影響藥劑之適用濃度 (Lim *et al.* 1993)。本研究切取自短縮莖的薄層培植體厚度僅 1 mm，培植體的細胞組織可以充分的與去病毒藥劑接觸，短縮莖的薄片培植體可取自瓶苗或花梗芽，不似取生長點需要顯微鏡設備

及要求較高之培養條件。若已建立有 PLB 繁殖系統，則利用高再生力 PLB 作為去病毒培植體的材料效果更佳，如果使用較小之 PLB (< 3 mm) 可以簡單橫切成兩個培植體，培植體的厚度在 1–1.5 mm，對於體積較大之 PLB 建議仍以薄片方式切取培植體作為去病毒處理之材料，讓薄片培植體與含有抑制病毒之培養基有充分之接觸，抑制病毒的增生，且建議利用繼代培養儘早將新生 PLB 與舊組織分開，因為快速生長之新生組織逃脫病毒感染的機率相對較高。

綜合本研究結果來看，蝴蝶蘭去病毒之效率主要取決於培植體的生長速度，去病毒藥劑 ribavirin 之濃度只要達到能夠抑制病毒的增生的標準即可。且低濃度 ribavirin 可避免藥劑本身對植物細胞產生之毒害作用，以低濃度 ribavirin 配合長時間處理，利用繼代培養時將新生芽體與舊組織分離，達到去病毒的效果。換句話說，在病毒生長受到抑制的情況下，具有快速生長能力的新生組織藉由連續繼代有效的將新生組織與舊組織分開，可以提高得到未受病毒污染新生組織之機會。這點可以從本研究中未曾使用 ribavirin 的 PLB 對照組，只靠迅速生長的新生組織，亦有機會在繼代後得到未被病毒感染之芽體得到證實。

## 引用文獻

- Albouy, J., C. Flouzat, C. Kusiak, and M. Tronchet. 1988. Eradication of orchid virus by chemotherapy from *in vitro* cultures of cymbidium. *Acta Hort.* 234:413–420.
- Chang, C. A. 2006. Diagnosis, identification, and detection of orchid viruses. p.103–118. *in*: Proceedings of Workshop on Identification and Diagnosis of Important Plant Pathogens (V). September 2006. Taipei, Taiwan. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, COA/Natl. Chung Hsing Univ., Taichung, Taiwan (in Chinese)
- Chang, C. A., D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1988. Characterization and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyviruses. *Phytopathology* 78:1266–1275.
- Chen, C. C., J. Y. Lin, Y. H. Cheng, and F. L. Chiang. 2010. Distribution of *Odontoglossum ringspot virus*

- on plant of *Cymbidium* spp. and its application on virus detection. *Plant Prot. Bull.* 52:17–24. (in Chinese with English Abstract)
- Chen, C. C., Y. L. Jhang, B. Y. Lin, F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2013. Serological reagent preparation and improvement of serological method to detect the *Plantago asiatica mosaic virus* in lily. *J. Taiwan Agric. Res.* 62:268–279. (in Chinese with English Abstract)
- Chien, K. W., D. C. Agrawal, H. S. Tsay, and C. A. Chang. 2015. Elimination of mixed ‘*Odontoglossum ringspot*’ and ‘*Cymbidium mosaic*’ viruses from *Phalaenopsis* hybrid ‘V3’ through shoot-tip culture and protocorm-like body selection. *Crop Prot.* 67:1–6.
- Jensen, D. D. 1951. Mosaic or black streak disease of *Cymbidium* orchids. *Phytopathology* 41:401–414.
- Kang, F. Y., S. T. Hsu, and R. S. Shen. 2011. Virus elimination through meristem culture and rapid clonal propagation by temporary immersion system in *Phalaenopsis*. *J. Taiwan Soc. Hort. Sci.* 57:52–63. (in Chinese with English abstract)
- Li, P. C. 2011. *In Vitro* Production of Virus-Free *Phalaenopsis* Orchids through Chemotherapy of Ribavirin and Multiplex RT-PCR Detection of *Capsicum chlorosis virus* and *Phalaenopsis chlorotic spot virus*. Master Thesis, Department of Plant Pathology, Natl. Chung Hsing Univ. Taichung, Taiwan. 50 pp.
- Lim, S. T., S. M. Wong, and C. J. Goh. 1993. Elimination of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy. *Ann. Appl. Biol.* 122:289–297.
- Milošević, S., A. Cingel, S. Jevremović, I. Stanković, A. Bulajić, B. Krstić, and A. Subotić. 2012. Virus elimination from ornamental plants using *in vitro* culture techniques. *Pestic. Phytomed.* 27:203–211.
- Morel, G. 1960. Producing virus-free cymbidium. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 29:495–497.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Nhut, D. T., J. A. Teixeira da Silva, B. Van Le, and K. Tran Thanh Van. 2003. Thin cell layer morphogenesis as a powerful tool in ornamental plant micropropagation and biotechnology. p.247–284. *in: Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications.* (Nhut, D. T., B. Van Le, K. Tran Thanh Van, and T. Thorpe, eds.) Kluwer Academic. New York. 515 pp.
- Panattoni, A., A. Luvisi, and E. Triolo. 2013. Elimination of viruses in plant: Twenty years of progress. *Spanish J. Agric. Res.* 11:173–188.
- Park, S. Y., E. C. Yeung, D. Chakrabarty, and K. Y. Paek. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Rep.* 21:46–51.
- Porter, K. G. and A. R. Kuehnle. 1997. Using dithiouracil and ribavirin to eliminate *cymbidium mosaic virus* during micropropagation of ‘Uniwai Mist’ *Dendrobium* orchid. *HortTechnology* 7:161–164.
- Toussaint, A., J. Kummert, C. Maroquin, A. Lebrun, and J. Roggemans. 1993. Use of VIRAZOLE® to eradicate odontoglossum ringspot virus from *in vitro* culture of *Cymbidium* Sw. *Plant Cell Tiss. Org.* 32:303–309.
- Wang, Q. C. and J. P. T. Valkonen. 2012. Cryotherapy of shoot tips: Novel pathogen eradication method. *Trends Plant Sci.* 14:119–122.
- Zheng, Y. X., C. C. Chen, and F. J. Jan. 2011. Identification and characterization of three new *Phalaenopsis* orchid-infecting viruses. *Acta Hort.* 901:127–132.

## Effect of Explant Type and Ribavirin Treatment on Virus Elimination of *Phalaenopsis* spp.

Chi-Ni Hsia<sup>1</sup>, Chin-Chih Chen<sup>2</sup>, Nan-Hsin Lin<sup>3</sup>, and Wei-Ting Tsai<sup>4,\*</sup>

### Abstract

Hsia, C. N., C. C. Chen, N. H. Lin, and W. T. Tsai. 2017. Effect of explant type and ribavirin treatment on virus elimination of *Phalaenopsis* spp. *J. Taiwan Agric. Res.* 66(2):146–157.

This study was conducted to determine thin section explants derived from stem or protocorm-like body (PLB) in combination with ribavirin treatments on virus elimination of the *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)-infected *Phalaenopsis* 'Tainung No. 1 Pixie'. Leafless *in vitro* shoots were cut into 1 mm thin sections as culture explants. Explants were soaked in liquid media containing various concentrations of ribavirin for less than 5 d culturing before culturing into the solid medium without ribavirin; or explants were cultured directly on solid media containing lower concentrations of ribavirin for one or consecutive culturing. Other than collecting survival rates of explants, leaves or roots which developed longer than 1 cm were cut out from regenerants for indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests. Samples reacted in negative by ELISA were tested further using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Results showed that high concentration of ribavirin (250 mg L<sup>-1</sup>) suppressed explant survival as well as shoot regeneration significantly. However, lower concentrations of ribavirin (25–75 mg L<sup>-1</sup>) for short duration were found not effective on virus elimination. A virus elimination rate of 26.7% was obtained from explants soaked in the liquid medium containing 50 mg L<sup>-1</sup> ribavirin for 2 d before subculturing on the solid medium containing 25 mg L<sup>-1</sup> ribavirin for 12-wk of culturing. Thin section explants cut from *in vitro* shoot stem or PLB were both cultured on the solid media containing 12.5–37.5 mg L<sup>-1</sup> ribavirin for two consecutive culturing. The highest virus elimination rate derived from stem or PLB thin section explants were 29.2% and 22.2%, respectively. However, a virus elimination rate of 100% was obtained from the control PLB explants which treated without any ribavirin. In conclusion, in order to obtain an efficient virus elimination system, highly regenerable explants cultured in the medium containing low concentration of ribavirin with least cytotoxic effect on regenerable cell growth but with suppression on virus proliferation for consecutive cultures would be recommended.

**Key words:** Orchid, Thin cell layer culture, Protocorm-like body.

---

Received: August 15, 2016; Accepted: September 23, 2016.

\* Corresponding author, e-mail: wtsai65@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Research Assistant, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Associate Research Fellow, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.