

組織培養瓶內苗細菌的檢測與防治

蕭芳蘭¹ 文紀鑾² 楊佐琦³

前言

組織培養技術已普遍應用於園藝作物的大量繁殖，其中生產健康種苗成為商業生產之主要目的，早期對健康種苗的認定是指未感染影響植株生育的病毒病，近年來，除了病毒以外，種苗是否攜帶細菌性或真菌性病原亦受到重視。組織培養過程中攜帶細菌性病原，於培養初期並無法以肉眼篩檢，需經長期繼代培養才會表現病徵，甚至在組培苗移植後才出現病徵，因此常造成量產上巨大損失。Cassels 等人指出許多組織培養實驗室受到細菌『爆發性』污染致使整批作物損失。Leifert 等人估算組織培養苗因為細菌污染造成20-55%的經濟損失。

感染組培瓶內苗細菌的種類

Stead 認為細菌感染組培苗包括三方面：(1)具病原性的細菌感染瓶內苗及成株，(2)具病原性的細菌僅感染瓶內苗，(3)非病原性的細菌污染瓶內苗(俗稱發霉)。針對此問題設計實驗調查本場生產的彩色海芋、馬鈴薯組培瓶內苗可能潛藏哪一類細菌。

首先測試具病原性的彩色海芋軟腐菌是否經由組織培養過程傳播至組織培養瓶內苗及成株，在瓶內苗接種彩色海芋軟腐菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*)，濃度分別為108cfu/ml、107cfu/ml、106cfu/ml、105cfu/ml、104cfu/ml、103cfu/ml、102cfu/ml、101cfu/ml，接種的菌量有20ul、50ul、100ul三種方式，共計24種處理；在25℃，每日照光16小時、黑暗8小時的環境



▲ 圖1.右：彩色海芋組織培養瓶內苗接種軟腐菌第六天顯現病徵
左：對照組

▲ 圖2.草莓組培移植苗種在溫室中並照顧其走莖

▲ 圖4.利用TZC平板培養基檢草莓組培移植苗的根、莖片段，僅部分產生深紅色非病原性的菌株。

1.農委會種苗改良繁殖場助理研究員

2.農委會種苗改良繁殖場助理研究員

3.農委會種苗改良繁殖場副研究員兼繁殖技術課課長

中，一星期內，各處理的軟腐菌侵入組織培養瓶內的彩色海芋植株，迅速蔓延造成瓶內苗整株軟腐；另以人工接種法將軟腐菌接種到彩色海芋組織培養之母瓶、增殖瓶、發根瓶的培養基內，結果軟腐菌均能在這些培養基上生長、繁殖，顯示彩色海芋軟腐菌無法潛伏感染彩色海芋組織培養瓶內苗，一旦感染，經過一星期便可使用肉眼判斷出來。

檢測組培瓶內苗細菌的方法

面對細菌污染或感染的問題，唯有適當的檢驗方法才能解決，Elphinstone 等人報告檢驗組培苗感染細菌的方法有三：(1)選擇性培養基分離法 (Selection Media)，(2)血清學的方法例如酵素連結抗體免疫分析法(ELISA)，(3)聚合酶連鎖反應法(PCR)。Stead 等人指出細菌之專一性抗體製備不容易，ELISA常出現偽反應，靈敏度不高，故用ELISA法檢測細菌較困難。至於PCR法需依賴貴重儀器設備、電腦軟體，僅適合特殊診斷。

本場試驗結果顯示(1)利用TZC選擇性培養基偵測豐克、克尼伯、卡地娜等品種的馬鈴薯組織培養之增殖瓶瓶苗，並未發現感染馬鈴薯青枯病菌的植株，全是健康株。(2)利用選擇性培養基TZC檢查草莓組織培養母瓶的瓶內苗，並未發現感染草莓青枯病菌

的植株。(3)溫室中種植草莓組培移植苗，經過2個月，草莓植株外觀無青枯病的病徵出現，故採取根、莖、葉、走莖等剪成1公分一小段，排放在TZC平板培養基上，培養48-72小時，結果培養基上植株片段兩端未出現粉紅色流體狀的青枯病菌，僅部分產生深紅色非病原性的菌株。

防治組培瓶內苗細菌的方法

(一)、降低初次感染源：培養基在高溫高壓滅菌鍋是否完全殺菌是很重要的問題，傳統利用靜置法(約2星期)觀察，缺點是耗時長，目前使用高溫殺菌指示劑(sterilizer control tubes)可在滅菌後由顏色從紅轉褐到綠判別之，如果殺菌完全，則管內液體立刻轉成綠色。

(二)、利用不同濃度的食品級防腐劑 sorbic acid(0, 0.5, 1, 2, 4g/l)添加於培養基中去除組織培養彩色海芋(cv. Pacific Pink and Neroli)瓶苗中的污染細菌(Pasteurella volantium)，經培養20天後，發現二品種在高濃度下均造成叢生芽體死亡，低濃度下僅有5-20芽成活，此二品種在5處理間均發現菌斑，故品種與處理間均無差異(表一)。

(三)、利用圓盤濾紙法進行培養基上的抗生素篩選試驗，測試7種抗生素對17支彩色海芋組培瓶內苗污染細菌的抑制效果，結果顯示：Tetracycline HCl的抑制效果最佳，抑制作用達到”+++”以上的有11支菌株，其次是Cefotaxime sodium，抑制作用達到”+++”的有8支菌株。7種抗生素對17支彩色海芋組培瓶內苗的污染菌各有不等程度的抑制作用，



▲ 圖3洗淨草莓組培移植苗及走莖進行全身檢查是否感染青枯病

但找不到一種抗生素可以抑制所有的污染細菌。而且抗生素容易產生抗藥性，故需交替使用，且希望能找到更好的其他方式防治彩色海芋組培瓶內苗的污染細菌(表二)。

結論

初期潛伏在組織培養瓶內苗污染或感染的細菌很難發現，等到肉眼可見時往往已造成嚴重損失。Leifert報告最普遍檢測組織培養瓶內苗細菌的方法是抽取組織培養瓶內苗放在特定的“指示培養基”(例如：523培養基、George and Falkingham's mycobacterium detection medium TT、Leifert and Waites Sterility Test Medium等)內加以偵測。本場利用TZC選擇性培養基管控馬鈴薯、草莓組織培養增殖過程不受到青枯病菌威脅。然而

指示培養基或選擇性培養基僅能檢測特定對象的細菌，無法利用一種培養基偵測所有重要的細菌。並且商品化檢測細菌的抗血清試劑亦僅能偵測一種細菌，價格昂貴不具經濟效益，尚無法應用在大量生產組培苗的品質管制流程。

為有效防止細菌在組培瓶內生長、繁殖的初次感染源是培養基殺菌完全，本場利用高溫殺菌指示劑於高溫高壓滅菌前與滅菌後的顏色變化作為培養基殺菌確效的指標，阻斷細菌在組培瓶內最初感染途徑，至於後續培養過程造成的污染或感染目前尚在找尋最佳的防治方法中。

▼ 表1.不同濃度之sorbic acid對彩色海芋(cv. Pacific Pink and Neroli)芽體生長之影響

sorbic acid	Pacific Pink		Neroli	
	增殖倍率(X)	芽體高度(cm)	增殖倍率(X)	芽體高度(cm)
0 g/l(ck)	1.8a	7.1a	1.5a	8.1a
0.5g/l	0b	1.0c	0b	1.0c
1.0g/l	0b	0.7c	0b	0.8c
2.0g/l	dead	dead	dead	dead
4.0g/l	dead	dead	dead	dead

▼ 表2.抗生素對彩色海芋組培瓶內苗污染細菌的抑制效果

菌株\處理	Gentamicin sulfate	Rifampicin	Cefotaxime sodium	Streptomycin sulfate	Polymyxin B	Tetracycline HCl	Gentamicin sulfate/ Streptomycin sulfate	CK
株 1	+	++	+++	+	+	+++	++	-
株 2	+	+++	+++	++	+	+++	++	-
株 4	+	++	+++	++	+	+++	+	-
株 5	+	-	-	-	-	-	+	-
株 7	+	++	+	+	+	+++	+	-
株 8	+	+++	+++	++	+	+++	++	-
株 10	+	++	+++	++	+	+++	+	-
株 12	-	-	-	-	+	-	-	-
株 15	+	++	+++	+	+	+++	+	-
株 17	-	-	-	-	+	-	-	-
株 18	+	++	-	+	+	++	+	-
株 19	++	+++	+++	++	+	+++	++	-
株 21	+	++	-	+	+	++	+	-
株 23	+	+++	-	+	+	+++	+	-
株 24	++	++	-	+	+	+++	+	-
株 25	++	++	+++	++	+	+++	++	-
株 27	+	-	-	-	-	-	+	-

*濾紙直徑為0.5公分，抑制圈大小表示法：“-”：<0.6公分，“+”：0.6~1.5公分，“++”：1.5~2.5公分，“+++”：2.5~3.5公分，“++++”：>3.5公分