

以熱療法進行'陽光麝香'葡萄組培苗去病毒

謝 鎧 枰¹⁾ 謝 慶 昌²⁾

關鍵字：葡萄、熱療法、去病毒、健康種苗

摘要：熱療法是將帶有病毒之植株放置於 35-54°C 的環境中數天至數週，使某些病毒在熱逆境下呈現不穩定，植物組織中的病毒部分被鈍化或完全失去活性。本研究乃利用組織培養的方法建立'陽光麝香'葡萄瓶苗，以提供熱療法進行去病毒處理，將獲得之無病毒苗供大量繁殖及生產健康種苗使用。以 37°C 進行熱療法去病毒，處理 30、35、40 及 45 天後其莖頂存活率均在 90% 左右，而植株再生率及每 4 週繼代存活率則以處理 30 天最低。經處理 30、35、40 及 45 天後，組培苗之 GLRaV-3 去病率均為 100%；在 GLRaV-3 感染程度上，以處理 45 天後之組培苗其檢測之吸光值是平均來得較低，顯示以 37°C 熱療法處理 45 天後，應可獲得高比例之無特定病毒健康種苗。

前 言

'陽光麝香'葡萄 (*V. labruscana* Bailey × *V. vinifera* L cv. Shine Muscat)，為歐美雜交二倍體鮮食品種，由日本於 2006 年進行品種登記，該品種果實外觀呈黃綠色、果粒大、糖度高、酸味少、果皮可食用且具有特殊香氣(Yamada *et al.*, 2008；王等, 2010)，可引進台灣作為葡萄產業具推廣潛力之品種。在栽培過程中其葉片會表現出畸形、捲縮及褪綠斑駁等症狀，婁等人(2017)也指出'陽光麝香'葡萄的葉片畸形、生長緩慢等症狀可能與病毒病存在一定的關係。在引種過程中，需針對感染病毒這一點來執行葡萄之去病毒處理，因此，推廣與栽種'陽光麝香'葡萄苗木的首要條件為生產無病毒之健康種苗。

熱療法是將帶有病毒之植株放置於 35-54°C 的環境中數天至數週(Panattoni *et al.*, 2013)，大部分於 36-38°C 下進行 21-35 天，能夠干擾或抑制某些病毒的複製(George, 1993；Knapp *et al.*, 1995)。因此，在高溫處理環境下，加速植物細胞生長，使新生之莖頂組織受病毒感染的比例降低(Walkey, 1980；許等, 2011)，亦能配合莖頂組織培養，切取較大的培植體，

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

提高培植體存活率，作為組織培養大量繁殖之用(Maliogka *et al.*, 2009)。

本研究係利用組織培養的方法建立瓶苗，以熱療法配合莖頂組織培養進行去病毒處理，並將組培苗出瓶馴化，獲得之無特定病毒健康種苗再藉由組織培養建立無病毒母瓶，供大量繁殖及生產健康種苗使用。

材料與方法

一、試驗材料

(一) 植物材料

本試驗之植物材料為栽植於台中縣霧峰鄉中興大學葡萄中心之田間與溫室'陽光麝香'葡萄(*V. labruscana* Bailey × *V. vinifera* L. cv. Shine Muscat)扦插繁殖之植株，以盆栽方式種植，供試植株依一般田間管理，於2017年3月至6月採取春、夏季副梢之腋芽作為初代培養之培植體。

(二) 基本培養基之配製及培養環境

初代培養基參照張氏(1986)之方法，基本培養基之配方為1/2MS鹽類，成分包括大量元素、微量元素、鐵源及有機酸和維生素。初代培養基中添加之植物生長節物質包括BA、kinetin、adenine及NAA；發根培養基只添加2 mg/L之IBA。基本培養基中添加蔗糖30 g/L及洋菜8 g/L；發根培養基另添加0.2 g活性碳。培養基於加入洋菜及高溫殺菌之前pH值以0.1N的NaOH或HCl調整為5.6-5.8。初代培養階段使用50 mL玻璃指形瓶，每瓶分裝15 mL培養基；發根培養之容器為500 mL之三角瓶，每瓶分裝90 mL培養基。培養基配製完成後瓶口以雙層鋁箔紙加封，置於高溫高壓殺菌釜內，以1.05 kg/cm²之壓力，121°C高溫滅菌15分鐘。培養室環境條件為溫度25±1°C，光源為植物燈和日光燈以1:1之比例組成，光強度為2500-3000 lux，每日光照16小時、暗期8小時。

(三) 熱療法之供試材料

取自初代培養所得之芽體以發根培養基繼代，每代時間為30日，熱療法處理30天之培植體，只經1次繼代，其餘處理皆經2-3次繼代之後，切取新生長之幼嫩枝梢作為培植體，以瓶苗為供試之材料。

二、試驗方法

(一) 熱療法配合莖頂組織培養去病毒試驗

處理前將培植體繼代至新鮮發根培養基，置於培養室2至3週，培養環境條件為溫度25±1°C，光強度為2500-3000 lux，每日光照16小時、暗期8小時。經2至3週後，待培植體頂芽恢復生長，分別將瓶苗移入日夜溫皆為37±1°C之恆溫調節箱中進行處理，以不同天數進行處理，分為30、35、40及45天4種處理，熱療法處理期間光照條件同前，恆溫調節箱內光強度則為2100-2200 lux。熱療法處理結束後切取2 mm (0.2 cm)大小之莖頂(圖

1)，植於發根培養基並移至 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 環境下培養，8 週後再繼代 1 次，爾後每 4 週繼代，待根系發育、植株葉片開展即可將瓶苗出瓶。熱療法處理結束後調查莖頂存活數量、存活率(每處理各個莖頂存活之比率)、8 週後植株再生數量、再生率(每處理各個莖頂再生之比率)、每 4 週繼代存活數、繼代存活率(每處理各個莖頂繼代存活之比率)。整個試驗過程以單一培植體為處理單位，避免交互感染，試驗進行 1 重複。

(二) 組織培養苗之馴化

將組織培養苗自蘭花瓶取出，以清水沖洗去除根部殘餘之培養基後，將小苗移植到五吋盆中，並添加栽培介質，培養環境為溫度 $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光強度 3400-3500 lux 之生長室，每 5 天澆水一次保持介質濕度(第一週在盆上覆蓋塑膠杯，第二週將塑膠杯斜放透氣，第三週則將塑膠杯除去，並移出生長室且置於室內之部分照光區域)，於移植四週後調查植株之存活率，馴化後移入雙層防蟲網室中隔離，依需要進行病蟲害之化學藥劑防治，並將栽種於田間之‘陽光麝香’葡萄成樹作為對照組，同時間點採取植株葉片作為檢測樣本，以雙層夾心式酵素連結抗體檢測法(Double-Antibody Sandwich ELISA, DAS-ELISA)檢測病毒感病情形並計算去病率。

(三) 病毒檢測方法

於 107 年 6 月 6 日採樣後，進行 GVA、GFLV、GLRaV-1 及 GLRaV-3 四種病毒的檢測。在田間採取疑似病毒感染病徵之植株含葉柄之新葉及老葉，共調查 10 株葡萄成樹，在網室中採取經熱療法處理之組織培養苗含葉柄之新梢及老葉，共調查 35 株葡萄苗。採取之葉片放入夾鏈袋中並標示清楚採取日期、植株編號及葉片所在植株部位，成樹及組織培養苗亦綁上吊牌標示，以利檢測後的定期追蹤，採取後立即送回種苗改良繁殖場進行分樣處理。

抗血清的來源購自 BIOREBA AG 商業公司，試劑套組包含陽性(+Check)及陰性(-Check)反應對照，並加入 coating buffer 混合研磨。ELISA 盤中每一穴注入 200 μL 混合液(包括只含包覆緩衝溶液之空白組)，於 37°C 靜置 2.5 小時，再以磷酸-Tween 20 緩衝溶液(PBST)沖洗 3 次，每次間隔 3 分鐘。供試植株葉片放入研磨袋中，以抽出緩衝液(PBST+2% PVP)研磨萃取，經低速離心後，每一 ELISA 盤中加入 200 μL ，於 37°C 靜置 3 小時，以 PBST 沖洗 3 次。ELISA 盤中加入 conjugate buffer (2% PVP, BSA 2 g)稀釋 1000 倍之酵素聯結球蛋白(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，每穴注入 200 μL 於 37°C 靜置 2.5 小時後，再以 PBST 沖洗 3 次。ELISA 盤中每穴加入基質緩衝液配製之鹼性磷酸酵素基質試液 200 μL ，進行呈色反應，最後加入 NaOH 以停止反應。試驗樣品以 ELISA 讀值分析儀測定波長 405/492 nm 下之吸光值，當檢測樣品吸收值為陰性反應對照組吸收值之 2 倍以下，即不含病毒；2 倍以上時，即該樣品含有病毒。供試樣品取 1 重複做病毒分析。



圖 1. '陽光麝香'葡萄瓶苗之莖頂外觀(bar=3 cm)

Fig. 1. The appearance of shoot tip *in vitro* on 'Shine Muscat' grape.

結 果

一、莖頂存活率及再生率之影響

'陽光麝香'葡萄組培苗在熱療法處理 30、35、40 及 45 天後調查莖頂組織存活率及再生率，評估在熱逆境下對植株莖頂生長是否造成影響，在存活數方面，處理 30、35、40 及 45 天後，依序為 59 個、84 個、76 個及 121 個；存活率則為 89.3、92.3、89.4 及 88.3%。顯示隨著熱療法處理時間增加，莖頂組織存活率有下降趨勢，以處理 45 天最低，為 88.3%，然而各處理間存活率差異不大。在處理 30、35、40 及 45 天後，切取 2 mm 莖頂組織培養 8 週之植株再生數，依序為 44 個、83 個、70 個及 101 個；再生率則為 74.6、98.8、92.1 及 83.5%。隨著處理時間的增加，莖頂組織再生率也相同的趨勢，以處理 45 天較低，為 83.5%，然而在處理 30 天後其再生率在各處理間是最低，為 74.6% (表 1)。觀察葡萄瓶苗在熱療法處理 45 天前及後之生長狀況，可發現處理前培植體葉色較深綠且葉片平展，根系呈白色；處理後培植體葉色淺綠且葉片些微往內捲，根系呈褐色，甚至造成有些培植體之莖頂褐化死亡(圖 2，紅色箭頭處)。於高溫環境下可能導致葉綠素合成受阻，新生之組織則呈現黃綠色或乳黃色(圖 2，黑色箭頭處)。

表 1. 熱療法後對葡萄莖頂組織存活率和再生植株率之影響。

Table 1. Effect of post thermotherapy on survival rate and regeneration efficacy of *in vitro*-shoot tip of grape plantlets.

Treatment (days)	Number of survived explants post-thermotherapy	Survival rate (%)	Shoot tips ^Y	
			Regenerated plantlets from shoot tips after 8 weeks	Regeneration efficacy (%)
30 ^Z	59/66 ^X	89.3	44/59	74.6
35	84/91	92.3	83/84	98.8
40	76/85	89.4	70/76	92.1
45	121/137	88.3	101/121	83.5

^ZNumber is thermotherapy periods (30, 35, 40 and 45 days) at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

^Y2 mm of dissected shoot tips.

^XNumbers indicated dissected shoot tips without browning/treatment number or regenerated plantlet after 8 weeks/dissected shoot tips.

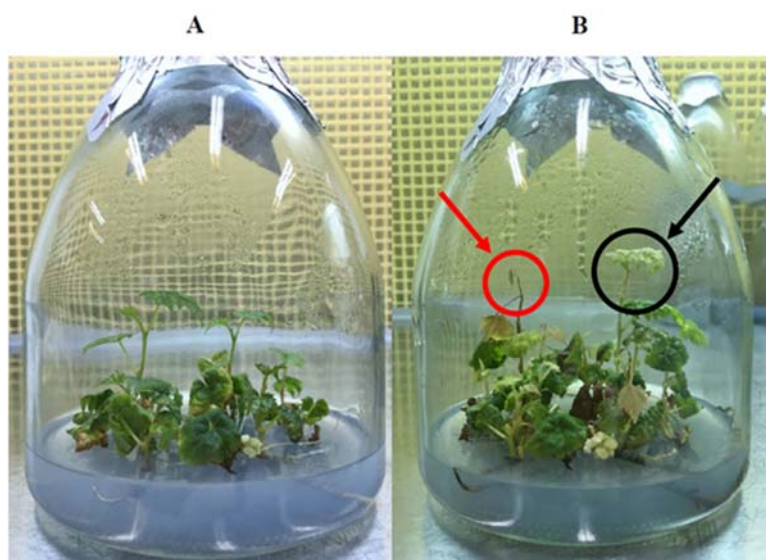


圖 2. 葡萄瓶苗於 $37\pm^{\circ}\text{C}$ 下熱療法 45 天之生長狀況。A：處理前、B：處理後。

Fig. 2. The growth statues of *in vitro*-grape plantlets treated by thermotherapy at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 45 days. A : Before treatment 、 B : After treatment.

二、繼代存活數及馴化後存活數調查

於熱療法處理後切取 2 mm 莖頂組織培養 8 週之再生植株，調查每 4 週繼代存活數及出瓶馴化 4 週後存活數。在繼代存活數的部分，熱療法處理 30、35、40 及 45 天後培養 12 週，依序為 22 個、77 個、65 個及 97 個；培養 16 週，依序為 20 個、71 個、59 個及 96 個；培養 20 週，依序為 18 個、70 個、53 個及 88 個，在培養 24 週及 28 週方面，與 20 週相比幾乎沒有變化，然而處理 45 天後培養 24 週及 28 週由於培養瓶內受到汙染，導致培植體生長及存活受影響，因此不做紀錄(表 2)。在繼代存活率方面，各處理於培養 12 週、16 週及 20 週有逐漸下降的趨勢，而培養 24 週及 28 週則有平穩的趨勢，以處理 30 天後其每 4 週繼代存活率在各處理間是來得最低(圖 3)。在熱療法處理 30、35、40 及 45 天之培植體，馴化後存活數依序為 2 株、10 株、5 株及 18 株，馴化後存活率可達到 76.9-100% (表 2)。

表 2. 再生植株之每四週繼代存活數及馴化四週後存活數。

Table 2. Survival number of subculture every four weeks and regenerated plantlets after four weeks of acclimation.

Treatment (days)	Survival number (week) ^Y						Plantlet after 4 weeks of acclimation	Survival percentage (%)
	8	12	16	20	24	28		
30 ^Z	44	22/44	20/44	18/44	18/44	18/44	2/2	100
35	83	77/83	71/83	70/83	70/83	69/83	10/13	76.9
40	70	65/70	59/70	53/70	53/70	53/70	5/6	83.3
45	101	97/101	96/101	88/101	- ^X	-	18/18	100

^ZNumber is thermotherapy periods(30, 35, 40 and 45 days) at 37±1°C.

^YThe number of shoots without browning from regenerated plantlets was recorded at the end of each culturing period.

^X- is not recorded.

三、去病毒之效果

在不同處理天數方面，以田間之'陽光麝香'葡萄成樹作為對照組，田間之 GVA、GFLV、GLRaV-1 及 GLRaV-3 罹病率分別為 0、0、0 及 40%。'陽光麝香'葡萄培植體以 37°C 處理 30、35、40 及 45 天後，組培苗內之 GLRaV-3 去病率均為 100% (表 3)。熱療法處理後去病毒效果，隨處理天數的增加並無差異，但去病毒效果皆可達到 100%。在 GLRaV-3 感

染程度部分，對照組有 4 株田間成樹其檢測之吸光值高於陰性反應組的 2 倍以上，甚至高於陽性反應組，然而以 37°C 處理 45 天後之組培苗其檢測之吸光值是平均來得較低的(圖 4)。

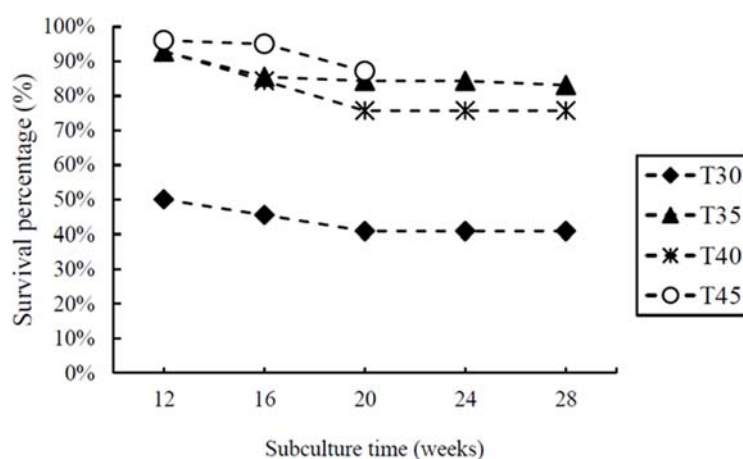


圖 3. 再生植株之每四週繼代存活率。

Fig. 3. Survival percentage of subculture every four weeks of regenerated plantlets.

表 3. 熱療法配合莖頂組織培養對生產'陽光麝香'葡萄無病毒苗之影響

Table 3. Effect of thermotherapy combined with shoot tip culture on generating virus-free plants of 'Shine Muscat' grape.

Treatment (days)	Viable plantlets analyzed ^Y	Percentage of virus free plants (%)			
		GVA	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3
CK ^Z	10	100 (10/10) ^X	100 (10/10)	100 (10/10)	60 (6/10)
30	2	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)
35	10	100 (10/10)	100 (10/10)	100 (10/10)	100 (10/10)
40	5	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
45	18	100 (18/18)	100 (18/18)	100 (18/18)	100 (18/18)

^ZNumber is thermotherapy periods(30, 35, 40 and 45 days) at 37±1°C, and CK is adult tree in the field.

^YAll survivor plantlets after 4 weeks of acclimation.

^XNumbers inside brackets indicated virus free plants/detected plants.

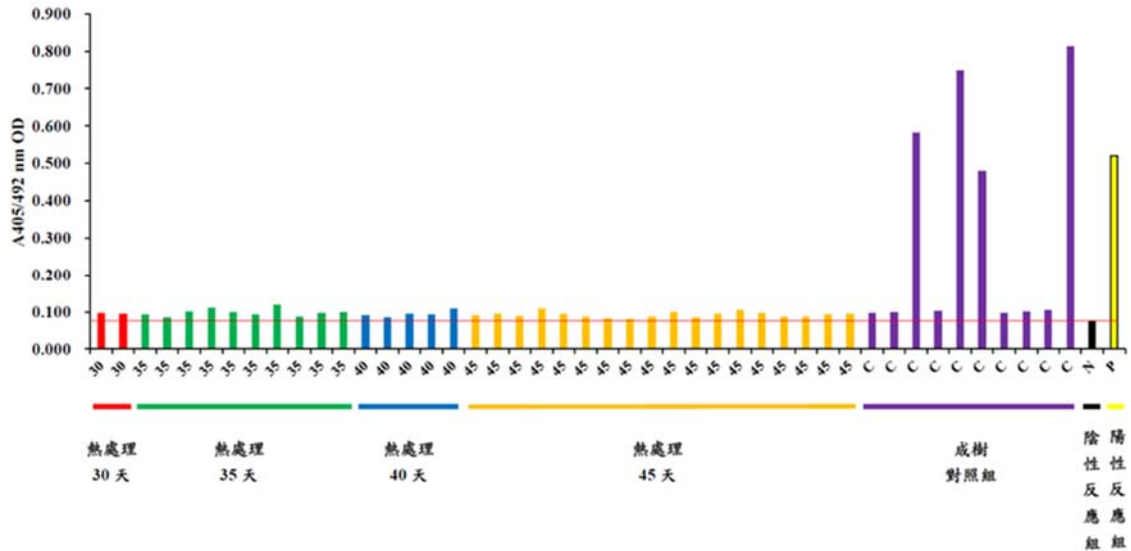


圖 4. 葡萄捲葉相關病毒-3 (GLRaV-3)感染程度

Fig. 4. The degree of infection of *grapevine leafroll-associated virus-3* detected by DAS-ELISA.

討 論

由本試驗結果可得知，將'Shine Muscat'葡萄瓶苗以 37°C 之高溫處理 30、35、40 及 45 天，可獲得達 90% 左右的莖頂存活率(表 1)，顯示高溫下不影響其莖頂的生長，與 Tan 等人(2010)研究指出高溫處理時間過長對植物體的生長和存活有負面影響是相異，可能的原因為植物材料來源為修剪後之扦插枝條，其母本樹在農民之果園中栽種達 3-4 年，已逐漸馴化且適應台灣夏季高溫氣候，對高溫逆境有程度上的抗性。植物在高溫環境下，其生理代謝會有所改變，以便於適應或抵禦高溫逆境(Levitt, 1980)。在高溫逆境下葉片內葉綠素合成受阻，且葉綠體膜層結構亦遭受破壞(陳與劉，1997)，使光合作用速率下降，進而影響光合產物的分配及代謝(Dinar *et al.*, 1983)，若熱療法處理之溫度高於溫度補償點，則會導致碳同化作用受影響，呼吸作用速率提高，植物體處於飢餓狀態，碳水化合物含量持續減少，最後引起植物體生長速率降低或死亡(柯，2000)，由此試驗得知'Shine Muscat'葡萄之溫度補償點可能高於 37°C。

學者們認為在高溫逆境下會造成蛋白轉譯作用無法正常進行，因而產生許多不正常的蛋白質，或使蛋白質變性、分解或活性降低，使蛋白質合成受抑制(Levitt, 1980)，並誘導熱休克蛋白(Heat shock protein)的表現(Sun *et al.*, 2010)，此熱休克蛋白質能保護核酸及正在進行轉譯的蛋白，使其能正常合成，且穩定蛋白質的結構，防止其變性，使植物體在

高溫逆境下具有較高之抗逆性。

生長點組織培養為快速且有效之去病毒技術，切取的大小越小，其去病毒成功率越高，然而尚存在切取技術門檻高及植株再生不佳等問題(Maliogka *et al.*, 2009)。本試驗為採用熱療法配合莖頂組織培養來進行去病毒，切取的莖頂大小為 2 mm，由結果得知，處理 35、40 及 45 天的植株再生率及每 4 週繼代存活率在 83%及 75%以上(表 2，圖 3)，顯示採用此方法不會對去病毒過程有較大影響。而處理 30 天的植株再生率及每 4 週繼代存活率則較其他處理差，培養基的 pH 值影響許多礦物營養的利用性(Scholten and Pierik, 1998)，Vacin 和 Went(1949)也指出培養基內 pH 值改變會導致磷酸鐵螯合物的形成，不溶性的磷酸鐵會在 pH6.2 或更高的情況下形成(Dalton *et al.*, 1983)，此結果可能與植入的培養基內 pH 值有關，此處理組所採用之培養基 pH 值偏高，可能造成某些無機物產生螯合而引起培植體營養缺乏或植體內滲透壓失衡而造成生長勢衰退，最後褐化死亡；另一原因為在植物發育期，具幼年性的植體有較高的分化能力，而大部分的果樹通常以成年的植體進行組織培養，因此必須先將植體幼年化，在瓶內培養時可切取幼嫩組織或經多次繼代並配合培養基添加 cytokinin 亦能逐漸恢復培植體幼年性(Hackett, 1985)，此次處理 30 天之培植體於初代培養後只經 1 次繼代，可能尚不足恢復幼年性，經熱逆境後切取之莖頂褐化程度較其他處理來得嚴重。

由去病毒的結果可知，帶病毒之培植體以 37°C 之高溫處理 30、35、40 及 45 天，均可獲得達 100%的 GLRaV-3 去病毒(表 3)，與田間之葡萄成樹檢測出 GLRaV-3 罹病率為 40% 相比，此次採用熱療法配合莖頂組織培養去病毒之效果算是成功的，而本試驗結果與葡萄(Valera *et al.*, 2003)、蔥(謝, 2006)、梨(Lizárraga *et al.*, 2017)、蘋果(Lizárraga *et al.*, 2017)、大蒜(Ghaemizadeh *et al.*, 2014)、唐菖蒲(Nezamabad *et al.*, 2015)及覆盆子(Wang *et al.*, 2008)等作物經熱療法處理可獲得無特定病毒苗之實例一致。學者們提出此一理論為在任何給定的溫度下進行去病毒處理，其檢測出植體中病毒的含量為病毒粒子複製與降解過程之間平衡的結果(Kassanis, 1957; Cooper and Walker, 1978)，高溫處理後可限制病毒之複製而使病毒持續降解導致病毒部分被鈍化或失去活性，此理論與經高溫處理後可獲得無特定病毒種苗之結果符合。

在自然環境下受到病毒感染的植物會發展出對抗病毒的防禦機制，由攜帶目標基因片段的病毒感染植物後，可誘導植體內源基因沉默(Virus-Induced Gene Silencing, VIGS)(Ruitz *et al.*, 1998)，RNA 沉默被認為是植物對抗病毒的細胞防禦機制途徑，而 RNA 沉默與溫度可能存在一定的關係(Szittyta *et al.*, 2003)，學者們認為增加熱逆境可誘導及提高寄主之防禦系統的能力，以感染樹薯嵌紋病(Cassava mosaic disease)之樹薯及菸草於 25-30°C 進行處理，進一步確定溫度對抗病毒沉默之機制的影響(Chellapan *et al.*, 2005)。Szittyta 等人(2003)將感染蕙蘭輪班病毒(*Cymbidium ringspot virus*)的圓葉菸草以 15 至 27°C 之間不同溫度處理，於每個處理溫度檢測 siRNA(short interfering RNA)的基因表現量，在 15°C 時檢測不到，在 21°C 時開始增加至 27°C 有顯著增加的趨勢，而 siRNA 作為 RNA 沉默中調控

防禦途徑的中心分子(Hannon, 2002),也顯示其作用受到溫度的強烈影響。RNA病毒進行複製時,會產生雙股RNA的中間產物,此複合體會被特異性核酸內切酶(Dicer)剪切為21-24 nt左右的siRNA(Bernstein *et al.*, 2001),在Szittyta等人(2003)的試驗中於15°C時檢測不到siRNA的表現量,推測可能的原因為Dicer屬於RNA酶且扮演著核心角色,其酵素活性在最適溫度條件時最高,所以在27°C時siRNA的表現量有增加的現象。因此,植物體於35-40°C進行熱療法處理之效果,可反映出植體內具有高度活化的RNA沉默活性。

根據本試驗之結果,在建立初代培養後,切取培植體植入含有2 mg/L IBA之培養基中,並經多次繼代,使培植體逐漸恢復幼年性,隨後切取新生之幼嫩枝梢植入新鮮之發根培養基中,以37°C之熱療法處理45天,處理後將存活之培植體切取2 mm大小之莖頂組織植入發根培養基中,待培植體根系充分發育且達出瓶栽培之大小,並於出瓶馴化後應可獲得高比例之無特定病毒健康種苗。

參 考 文 獻

- 王世平、徐衛東、顧巧英、王林軍。2010。日本鮮食葡萄品種發展動向。中外葡萄與葡萄酒 9: 45-47。
- 柯勇。2000。作物病害與防治。藝軒圖書出版社。pp. 98-121。
- 許傳俊、黃琚梅、曾碧玉、許文江。2011。植物組織培養脫毒技術研究進展。安徽農業科學 39: 1318-1320。
- 張莉莉。1986。葡萄莖頂生長點培養之研究。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。
- 婁兵海、白先進、宋雅琴、白揚、王博、陳愛軍。2017。'陽光玫瑰'葡萄中主要葡萄病毒病原的檢測。植物保護學報 44(2): 345-346。
- 陳立松、劉星輝。1997。高溫脅迫對桃和柚細胞膜透性和光合色素的影響。武漢植物學院 15: 233-237。
- 謝叔娟。2006。四季蔥'蘭陽一號'及'桃園三號'去病毒技術之研究。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。94 pp.。
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409: 363-366.
- Chellapan, P., R. Vanitharani, F. Ogbe, and C. M. Fauquet. 2005. Effects of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. *Plant Physiol*. 138: 1828-1841.
- Cooper, V. C. and D. G. A. Walkey. 1978. Thermal inactivation of cherry leaf roll virus in tissue cultures of *Nicotiana rustica* raised from seeds and meristem-tips. *Ann. Appl. Biol*. 88: 273-278.
- Dalton, C. C., K. Iqbal, and D. A. Turner. 1983. Iron phosphate precipitation in Murashige and

- Skoog media. *Physiol. Plant.* 57: 472-476.
- Dinar, M., J. Rudich, and E. Zamski. 1983. Effect of heat stress on carbon transport from tomato leaves. *Ann. Bot.* 51: 97-103.
- George, E. F. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. 2nd ed. Exegetics Limited, Edington. 645pp.
- Ghaemizadeh, F., F. Dashti, G. Khodakaramian, and H. Sarikhani. 2014. Combination of stem-disc dome culture and thermotherapy to eliminate Allxiviruses and Onion yellow dwarf virus from garlic (*Allium sativum* cv. Hamedan). *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 47: 499-507.
- Hackett, W. P. 1985. Juvenility, maturation and rejuvenility in woody plant. *Hort. Rev.* 7: 109-14.
- Hannon, G. J. 2002. RNA interference. *Nature.* 418: 244-251.
- Kassanis, B. 1957. Some effects of varying temperature on the quality and quantity of *Tobacco mosaic virus* in infected plants. *Virology.* 4: 187-199.
- Knapp, E., V. Hanzer, H. Weiss H, A. da Câmara Machado, B. Weiss, Q. Wang, H. Katinger, and M. Laimer da Câmara Machado. 1995. New aspects of virus elimination in fruit trees. *Acta hortic.* 386: 409-418.
- Levitt, J. 1980. *Responses of plants to environmental stress*. 2nd ed. Academic Press, London. 607pp.
- Lizárraga, A., J. Ascasibar, and M. L. González. 2017. Fast and effective thermotherapy treatment for *in vitro* virus eradication in apple and pear tree. *Am. J. Plant. Sci.* 8: 2474-2482.
- Maliogka, V. I., F. G. Skiada, E. P. Eleftheriou, and N. I. Katis. 2009. Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining *in vitro* thermotherapy with shoot tip culture. *Sci. Hortic.* 123: 280-282.
- Nezamabad, P. S., M. K. Habibi, A. Dizadji, and S. Kalantari. 2015. Elimination of *Bean yellow mosaic virus* through thermotherapy combined with meristem-tip culture in gladiolus corms. *J. Crop Prot.* 4 (4): 533-543.
- Panattoni, A., A. Luvisi, and E. Triolo. 2013. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Span. J. Agric. Res.* 11 (1): 173-188.
- Ruitz, M. T., O. Voinnet, and D. C. Baulcombe. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell.* 10: 937-946.
- Scholten, H. J. and R. L. M. Pierik. 1998. Agar as a gelling agent : Differential biological effects *in vitro*. *Sci. Hortic.* 77: 109-116.

- Sun, J. H., J. Y. Chen, J. F. Kuang, W. X. Chen, and W. J. Lu. 2010. Expression of *sHSP* genes as affected by heat shock and cold acclimation in relation to chilling tolerance in plum fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 55: 91-96.
- Szittyá, G., D. Silhavy, A. Moinar, Z. Havelda, A. Lovas, L. Lakatos, Z. Banfalvi, and J. Burgyan. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *Embo J.* 22: 633-640.
- Tan, R. R., L. P. Wang, N. Hong, and G. P. Wang. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 101: 229-235.
- Vacin, E. F. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110: 605-613.
- Valera, M., A. Ibanez, and A. Morte. 2003. Effects of high vineyard temperatures on the *Grapevine leafroll associated virus* elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. *Sci. Hort.* 97: 289-296.
- Walkey, D. G. A. 1980. Production of Virusfree Plants by Tissue Culture. In: *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, Ingram and Helgeson (eds.), Oxford Blackwell. pp. 109-117.
- Wang, Q., W. J. Cuellar, M. L. Rajamaki, Y. Hirata, and J. P. T. Valkonen. 2008. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus elimination : Relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Mol. Plant Pathol.* 9: 237-250.
- Yamada, M., H. Yamane, A. Sato, N. Hirakawa, H. Iwanami, K. Yoshinaga, T. Ozawa, N. Mitani, M. Shiraishi, M. Yoshioka, I. Nakajima, M. Nakano, and R. Nakaune. 2008. New grape cultivar 'Shine Muscat'. *Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci.* 7: 21-38.

Virus Elimination of *in vitro* Plantlet of 'Shine Muscat' Grape by Thermotherapy

Hsuan-Ping Hsieh¹⁾ Ching-Chang Shiesh²⁾

Key words: Grape, Thermotherapy, Virus elimination, Healthy seedlings

Summary

Thermotherapy is keeping virus-infected plants at temperatures between 35°C and 54°C for a few days or weeks to make some viruses unstable under heat stress and to inactivate viruses in plant tissues. The objectives of this study were to establish 'Shine Muscat' grape plantlet *in vitro* via tissue culture and to utilize thermotherapy combined with shoot tip culture to eliminate viruses and to achieve mass production of virus-free plants. By using thermotherapy at 37°C for 30、35、40 and 45 days, a high survival rate about 90% of *in vitro*-shoot tip can be achieved. However, regeneration efficacy and survival percentage of subculture performed every four weeks were the lowest in the treatment of 30 days. A 100% GLRaV-3 virus elimination rate of *in vitro* plantlet was obtained in the treatments of 30、35、40 and 45 days. The degree of infection of *grapevine leafroll-associated virus-3* in the plantlets was lower in the treatment of 45 days as determined by DAS-ELISA. Results from these study indicated that thermotherapy at 37°C for 45 days may obtain a high proportion of non-specific virus-free healthy seedlings.

1) Graduate student in Master Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
Corresponding author.

