



香蕉與菜蕉品種改良之無菌培養技術

施美秀 柯立祥 譯

譯者按：品種改良，如豐產、抗病蟲、增進品質……等等，在農業生產上是最根本與重要之課題，農業有關之研究機關與人員，無不處心積慮在設法就現有品種加以改良，以更符合農業生產之目的。傳統之品種改良向以雜交育種、選種、引種……著手，而以雜交育種及選種為主，然此傳統育種技術，對一般具稔性之二倍體植物，極容易得到不同之新品種（不論是好是壞），且有可能得到吾人所希望之品種，然對於三倍體且不稔性之作物，如香蕉，則甚為不易，更難望十年有成者。在香蕉，到目前為止，近 60 餘年來，尚無以傳統育種方式育出吾人可接受之具商業性價值之品種，傳統育種在香蕉（三倍體植物）品種改良之困難可見一斑。

近年來，無菌培養與遺傳工程等生物技術之突飛猛進，給許多傳統育種或品種改良所遭遇到之障礙，提供了突破之希望與美麗之遠景，雖然此技術達吾人所需要之理想尚有一段漫長之距離，但目前仍被視為最可行與值得開發投資之一項技術，亦因此深受政府研究機關及人員重視，事實上，許多此方面之技術已被應用，如許多作物之加速繁殖即為一例。

在本省香蕉黃葉病之蔓延與控制，一直困擾著我們，此一曾經令國外香蕉公司與研究人員不知所措之病害，除了改植抗病品種外，一籌莫展。然在本省據香蕉研究所之研究顯示，日前所有國內外品種似尚無可供取代現有品種之具商業性價值抗病品種，甚至提供傳統育種所需之抗病基因亦似尚無發現。際此香蕉傳統育種困難重重之際，無菌培養與遺傳工程等生物技術，提供了吾人頗值得嘗試進行之一條途徑與希望。因此譯者等仍將紐約州立大學 A. D. Krikorian 及 S. S. Cronaue，在 1984 年發表在經濟植物學（Economic Botany）期刊，38 卷 3 期：322-331 頁之「香蕉與菜蕉品種改良之無菌培養技術」一文譯出，以供有興趣於此方面之人士參考。

事實上，本省香蕉黃葉病在抗病品種尚未出現之際，為了防範或減低黃葉病之危害，仍採逃避與配合健康無病蕉苗種植為主，亦因此，近年來為了配合新蕉園無病苗在短時間內之大量需求，台灣香蕉研究所先利用 1970 年代初期國立台灣大學園藝系馬溯軒及許圳塗兩教授共同發表之香蕉莖頂無菌培養方法加以調整與應用，大規模供苗；每年達數十萬株，規模之大堪稱世界之冠，與目前其他國家之研究仍在實驗室之規模不可相提並論。目前台灣香蕉研究所亦利用此生物技術，配合大規模繁殖同時朝向誘變育種與抗病篩選而努力，可望短期能有結果。



摘要

花香蕉生產上，鑑定或產生對黑型葉斑病（Black Sigatoka）其有耐病或抗病性之煮食蕉及鮮食蕉品種是迫切需要的（譯者按：對本省香蕉而言，抗黃葉病品種之出現，尤為重要）。在果樹中，香蕉可能是最具不稔性的栽培性水果，因此抗病育種相當困難。此篇綜合性概述指出利用無菌培養技術來產生或增殖特殊耐病品種之潛在價值，特別強調在各種基本原理及目前已有之各種層次之複雜方法或是許多在實用前仍須要進一步開發之方法。本文之態度是嚴謹的，所謂組織培養方法應用在香蕉育種及品種改良之模式，不僅可應用芭蕉屬（Musa）之作物，也可應用於其他困難育種之作物。

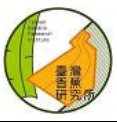
前言

無菌培養及新的分子生物學技術目前已漸漸成為改良作物及其他重要經濟植物的一種方法，改良的範圍從大量增殖（或繁殖）吾人迫切需要的營養系品種，或篩選植物遺傳型及表現型（genotype/phenotype）等等，如小說上所說的其有重要特點或品質之實驗室中之遺傳工程植物。目前在此方面有些技術方法已被應用，但許多仍還在實驗研究階段，而大部分目前所謂整合性之利用，只不過是種樂觀的期望或希望而已。

傳統的植物育種及選種是一般新品種例行育出的共同途徑，但此法一般都用於具稔性以及能產生活性胚（embryo）的作物育種，然不具此特性的品種則有困難。在育種方法中，誘變育種也是品種改良的方法之一，但像其他每一件事情一樣都有它本身特殊問題之困擾。

吾人在決定進行研究此一無菌培養等新方法在某一條件下之利用潛力時，不可掉以輕率，因為它不僅需要技術，而且不便宜，且通常必須要從沒有開始發展。即使如此，有少數例子我們可以想得到的，新技術若可以獲得，即使是在實驗的應用，對作物品種改良亦較在香蕉及菜蕉（譯者按：香蕉一般指鮮食水果香蕉，而菜蕉（plantain）是指供主食用之煮食蕉）方面，扮演更好的角色。因芭蕉屬可食性品種都是屬於所有栽培作物中，最具不稔性者，所有品種都是選自自然發生的，而且最主要均是無種子的族群，因此品種改良困難。事實上，在商業的規模上，香蕉仍尚無一品種是人類利用傳統育種方法育出者。

在熱帶或亞熱帶地區的農人，由經驗都知道須多種植些香蕉植株以確保每天有足夠的果實以供煮食或鮮食。如果有病蟲害之問題出現，通常有些需求助於所有之災害倖存的，因為香蕉具有易變的種質（Germplasm base）（譯者按：種質是形成遺



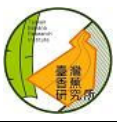
傳性質物理基礎的遺傳物質，它經由生殖細胞一代傳到下一代。)。而在商業上早期所開發種植的香蕉品種（及菜蕉）主要是單一營養系（monoclonal），對病原菌均具有高度罹病性。而吾人對此罹病性之瞭解可以說是主要來自以往很重要的外銷香蕉品種“大米七”（Gros Michel）品種。在 1950 年代末期，大米七香蕉品種因感染黃葉病（*Fusarium oxysporum f. cubense*），而毀滅廢棄（譯者按：大米七香蕉，以往是中南美洲地區最主要栽培品種）。後來被具有抗黃葉病之卡門第司（Cavendish）一類之品種所代替（譯者按：目前經濟上經濟栽培的香蕉，均屬此類之香蕉。），但在商業的運作上品種還是單一品系（monoclonal）。

現在另一不同的問題是叫做黑型葉斑病（Black Sigatoka）病害，威脅著世界上的香蕉及菜蕉生產。葉斑病是一種葉部出現斑點之病害，由 *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* 之真菌所引起，此病正嚴重的為害許多香蕉及菜蕉栽培的國家。雖然噴藥作業可控制此病，但費用昂貴，即使大栽培者亦難以負擔，在香蕉外銷產業，僅葉斑病防治一項之費用，每年即超過 1 億美元。

利用傳統的雜交育種方法要育出抗或耐葉斑病（或其他病害）之品種最多只能是一種長程計畫，因為它的方法是把現有具有抗病性之野生二倍體品種的抗病基因轉移到具商業性的四倍體品種中。對那些沒有優良二倍體者，就必須在長程育種計畫之初先找出抗病者，然後才能得到商業性的多倍體。方法是以雄稔性品種之花粉與雄不稔性而雌稔性之雌花雜交。最主要的母本是用三倍體香蕉，但絕對不是香蕉育種者的唯一方法。以此法可產生少數的四倍體後代，其是由雌花之含 3 倍體組（ $3N$ ）的卵細胞與父本之單倍體組（ $1N$ ）之配子結合而成。因為在雜交的果實中，會有少量種子產生。此種雜交育種方法，大約須要 3 年才能看到一個雜交結果；有人甚至估計從開始到培育出適當的耐葉斑病的外銷品種約須 10 年，但無法保證如此育出之品種是否會有市場價值。另外的問題就是傳統的育種方法，其腳步往往趕不上新病害的發生。若嘗試引進迄今只在某特定地區受歡迎的可食性品種，其具有吾人想要的抗病性，是不成問題，但其最主要的問題就是在是否受消費者喜愛以及是否有商品性，特別是要外銷西方市場的杏礁尤屬重要，因為它必須要遵守頗為苛刻的要求，如形狀、味道、後熟型態等。因此，若要很快發現既抗病且具有優良性狀的香蕉品種實在不可能（但利用此方法要找出可接受的菜蕉品種的機會比較大）。在印馬地區（Indo-malay）是芭蕉種質（*musa germ plasm*），大部分變異發生的地方，但此區經常受到萎縮病的為害，而此病是經由病毒（virus），或類病毒（viroid）所引起，此病在西半球並不存在，所以在引種時要特別謹慎以免因疏忽而引進該病，話雖如此，說總是比做來得容易。

有鑑於此，利用其他方法，不論單一的或是與傳統的育種方法相配合，以產生改良的香蕉或菜蕉是有其可能性的。

利用無菌培養技術做為育種的補助方法，吾人可擬定幾種方法，以做為產生吾



人在平常難以獲得的種質之方法。可利用胚珠培養的方法，在試管中進行低稔性胚囊之授精，利用取出胚方法進行或利用除去特殊病原菌的方法，可使從不同國家及地區之引種更為容易。此外在平常供應數量受限制而無法大量供應的品種，利用無菌培養來繁殖亦是另一種可利用的方法。我們在本文中將接觸到這些方法，但其他培養技術，包括誘變也都可用在組合育種 (Combination breeding) 計畫中，也是本文主要強調之處。

以下我們只將一些無菌培養技術之方法及其可行性加以簡要之概述。

胚培養 (Embryo Culture)

追溯至 1920 年代初期，就有人利用在無菌培養下來刺激胚的生長，但結果並不穩定。

此後胚培養技術就被用來促使在一般情況下，胚不能正常發育成小植株的植物，使其胚能正常生長成小植株的例行方法。芭蕉屬植物的種子胚培養方法在育種上是一很有價值的輔助方法。例如在育出抗線蟲之二倍體香蕉（具有種子）上，此技術是很有用的。目前此技術之應用一直在進行，但發表之文獻卻很有限，對於胚的培養仍有許多事情需要進一步了解。此外胚培養方法亦可能從二倍體種子中的三倍體組 (3N) 胚乳之培養而產生三倍體香蕉（包括 AAA, BBB, ABB 或 AAB）。

頂端分生組織或莖頂培養 (Apical or Shoot-tip Culture)

在 1960 年代，發現東亞蘭 (Cymbidium) 利用適當的方法切取生長點莖頂進行無菌培養，能產生類似正常可生長成小植株的芽體 (protocorm) 的凸狀物 (protuberances)。此一發現進而促進無菌培養在增殖及植體保存方面之進一步發展。莖頂培養在許多植物已被用來取得或維持或增殖原種 (stock)。有些是從一個莖頂繁殖一棵植株，有些則是產生多量的植株。只要利用分切方法，可使從生長點部分長出的芽以一定的速率無限制的長出。我們『要調整與維持培養基之平衡有利於分化生長之繼續進行即可。當這些芽（有根或無根）從增殖體移出，再轉移至不同的環境或培養基，有助於這些移出芽之進一步發根。而移出芽體後剩餘部分可在繼續增殖與生長出新芽，以取代被移出的部分。1970 年代初期，在台灣發表的報告謂：從香蕉切離之莖頂組織培養可刺激不定芽之生長，(譯者按：此報告係國立台灣大學園藝系馬溯軒及許圳塗教授所共同發表)此早期之報告更激發在這方面之探討。在 1974 年 Berg 及 Bustamante 發現由已感染病毒之植株的側芽，利用單一生長點繁殖的方式，經分生組織取出培養組織，配合熱處理及無菌培養技術可得到無嵌紋病毒的卡門第司群 (Cavendish group, AAA) 香蕉。此後，組織培養的方法與技術有相當的改進



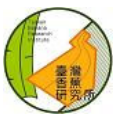
，因此不但在短期間內可得到大量的植株，且能在 3~4 天使芽發根。莖頂繁殖方法顯然的在增殖方面較一般育種方法更具潛力，因通常一般育種或繁殖工作無法很快的大量增殖所需植物以及大量生產無特殊病原菌之植株。由於生長點或莖頂培養是在無菌狀態下培養，因此，生長點（莖頂）亦可用來作為保存無病（細菌性或真菌性）的母株或原種（stock），以供種質交換、轉移及運送之用。但是毒素病還是一個問題。一般瓜類嵌紋病毒（Cucumber mosaic virus）以無菌生長點培養技術能夠去除，但其他病毒或類病毒則難以確定是否能夠去除。在這方面仍須更多的努力，特別是需要發展絕對無病毒之材料（axenic material）。因為無病毒植株的生育一般更健壯，且其產量亦更增加。

從商業性的展望來看，在香蕉，就是一直到最近，引進的香蕉新品種需要很快的大量增殖繁殖並不是香蕉產業的主要問題，因為外銷香蕉之品種，其改變相當的慢，且新的企業相當的少，所以快速繁殖一般並不是香蕉產業的瓶頸。然而在需要提供大量較新品種之乾淨的種植材料給因種種原因而廢棄的蕉園時，則在開始供應大量新的種植材料時有其實質上的重要性。

理論上，吾人應有許多得自各不同地區的香蕉營養系或品種的分生組織（生長點），並使之保存在種質銀行（germ plasm storage bank）中，在此銀行中，種質之保存方法是在無菌培養狀態，其環境及培養基之成份，要使種質之增殖是在最低程度，或甚至利用冷凍保存（cryopreservation）方式。當須要之時，再從靜止或冷凍狀態將組織材料移出培養，利用適當之培養基或操作以促進增殖。這些理念之可行性一般認定是有實際需要的。

突變育種（Mutation Breeding）

- （一）利用頂端分生組織培養：有些研究者強調若利用無菌培養技術做為產生香蕉或菜蕉變種的方法能夠進行、應用及產生，則此技術的效益將隨之增加。少數這方面的工作目前已經被進行，包括利用 γ 射線在切離和培養分生組織或生長點前先行照射。在香蕉，此方面的研究目前才開始受到重視，因對香蕉而言，定是有些真正的潛在性，因為香蕉利用生長點無菌繁殖過程所產生的小植株很細小，頗適於誘發突變的操作。此人為控制產生的變異體（variant）並不是不重要，但因體細胞變異使香蕉具相當的複雜性。在數種香蕉突變中有許多突變係重複的發生，亦因此這些變異中有些會產生在經濟上其有重要性的香蕉品種，就像高門品種（Highgate）香蕉的產生，就是由大米七香蕉突變而來。由於外銷香蕉的育種，在母本的種質方面相當有限，亦就是所有的母本均是高門品種（三倍體），因此出現可用的母本種系的變異體是很有價值的。事實上，如果高門品種或大米七等品種之變異體能產生，則育種者的工作



將更容易些。同樣的，四倍體的產生，可利用二倍體培養使自然產生核內染色體多倍化 (endopolyploid-ization) 或利用秋水仙素處理均可以產生四倍體香蕉。我們知道透過分生組織培養繁殖，在特殊情況下即使沒有加誘變劑，其本身也是有變異的可能。當然，不能保證在這種情況下的變異會有包括抗黑型葉斑病的香蕉出現。

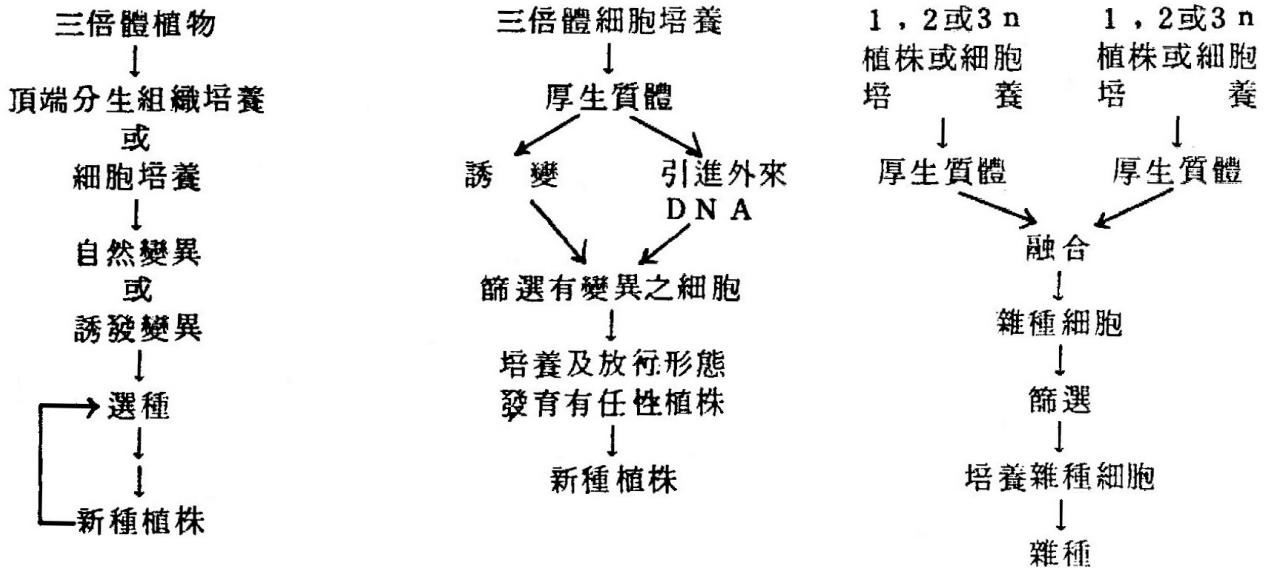


圖 1. 利用細胞、原生質體及頂端分生組織培養技術產生新種香蕉或菜蕉之流程圖

(二) 利用細胞及原生質體培養：展望將來，最具挑戰性及報酬性的工作，最後應是應用突變育種技術於細胞及原生質體之誘變育種。主要是利用從單離的細胞具有分化成小植株的潛力（此與已經由許多細胞組織好的分生組織所產生小植株者不同）。這些單細胞具有分化成為小植株的能力，稱為全能性 (totipotent)。因此再經由細胞培養技術，則篩選可能有用的突變體的機率，將大大增加，這是因為理論上許多單細胞都可能彼此相互受影響，而且都有分化成植株的能力。任何植物的全能性細胞 (totipotent cell) 懸浮液的介紹，(在香蕉及菜蕉較少) 所以受到重視是因為頗難成功，但我們從體細胞組織可得到接合子胚 (zygotic embryos) 之結構物給我們相當的鼓勵。此亦強烈的顯示，細胞或組織具有形態發育的 (morphogenetic) 潛能，但必須是在控制的條件下誘發產生。因為細胞培養通常已可以分化生長，所以在某些作物，可用來作為產生變異的方法，而且其成果甚至較一般傳統育種者來得多，亦因此一般希望此一方法能配合誘變劑的使用，則經由細胞懸浮培養來誘變育種的機率將更為增加。

原生質體或細胞利用纖維素分解酵素 (cellulose degrading enzymes) 來溶去纖維素細胞壁後，可給予更複雜的方法，以誘發細胞變異成類似香蕉一樣



之營養繁殖的植物。理論上，製配全能性原生質體 (totipotent protoplasts)，再以誘變劑處理，然後再儘可能的培育成為植株，此種方式與細胞培養者不同，只是在細胞培養是由成熟植物體之細胞直接培養，不須先在細胞培養中分離及引出全能性細胞。吾人可以想像將來可能利用不稔性三倍體與單倍體之原生質體進行融合以形成四倍體，或者利用二倍體與單倍體之原生質體融合以產生三倍體，甚至於以單倍體與單倍體融合以產生二倍體。藉著製備原生質體的方法來克服在細胞融合上因細胞壁存在之障礙，則原生質體融合技術可進一步使兩種不相關品種的細胞核融合，產生重新組合之細胞而長成新的植物。由圖 1.可看出此法如何進行，亦顯示細胞可看出此法如何進行，亦顯示細胞可利用誘變劑及遺傳工程技術，再配合原生質體方法以及細胞培養的方法，可將細胞加以修改。

討論

我們強調吾人即使是審慎的考慮有限度的開發前面所提及的任何構想或為了實際的利益而應用前述的方法，在開發或應用之前，每個人必須對所有的無菌培養方法以及它與芭蕉屬有關的問題均需透徹的了解。

在書刊及科學文獻上經常看到一些報導，提及對一些在經濟有重要性植物的例行有用或應用的新技術，但在其簡化為實際的真正應用技術之前，科學上的問題要先解決的。既使如此無菌培養技術之受重視，因為其與香蕉及菜蕉有關，而且是那些像分生組織及莖頂培養等有用的方法，目前已經存在，且其可在目前遇到某些迫切立刻需要的問題時而成名。同時，為更長程及更基本之問題，包括利用芭蕉染色體組織的全部知識之真正的遺傳工程等必要基礎的需求必定會遭遇到。

有關無菌分生組織細胞及原生質體培養技術對香蕉及菜蕉之改良是否具有潛力，我們已曾加以測定與評估，在此不必再談細節，但我們覺得對全部問題做更一致努力的時刻已經到了。我們需要研究全能性組織，細胞及原生質體培養的建立與成長的精確介量 (parameter)，然後仍需要闡明，使全能性細胞與原生質體接受病原菌或誘變劑之處理的適當條件。特別需要注意的，要使上述方法儘可能可靠，且接受處理的比較試驗，應該利用較大範圍的營養系材料與生物型 (biotypes) 較為適當。

從單細胞或原生質體，在可控制系統下產生一完整的植株，就是遺傳工程技術的精髓。沒有這種能力就不可能產生或選出抗或耐性的新種質。分生組織培養有其重要性與潛在價值，但不可能取代細胞及原生質體培養。不論這方面再發展的機會如何，讀者現在對真正問題的所在應有更深的了解，而在組織培養方面，香蕉所碰到的問題，對所有其他的植物也都是一樣的。