

一、生物技術及組織培養

(一)彩色海芋末熟胚利用電穿孔轉殖耐軟腐病基因之研究

陳駿季、沈翰祖、孫永偉、廖玉珠、楊佐琦、蕭芳蘭、劉明宗

取彩色海芋'Black magic'品種自交授粉後60天、70天、90天之未熟胚轉殖耐軟腐病*sapI*基因(由中研院馮騰永老師提供)，利用電穿孔配合滲透壓調節方式將構築後之SAP1質體導入未熟胚內。經處理之未熟胚以組織培養方式使其繼續生長，期間並以選擇性培養基篩選。

利用聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)分析是否轉殖成功。偵

測*sapI*基因是以目標基因、部分CaMV35S promoter與部分NOS terminator為模板(片段長度約600bp)，引子為5' AAGGGATGACG-CACAATCCCCTATCCTTC 3' 及 5' TGATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGGAT 3'，其PCR產物片段大小約600bp，結果顯示1, 5, 7, 8, 9, 10號轉殖株有較明顯的條帶，2, 3, 4號轉殖株有較淡的條帶出現(圖1-1)。

再以南方墨點(Southern blot)分析檢測轉殖株之基因組DNA中是否含有SAP1基因，結果顯示1, 4號轉殖株有較明顯的訊號，2, 5, 7號轉殖株有較淡的訊號出現(圖1-2)。

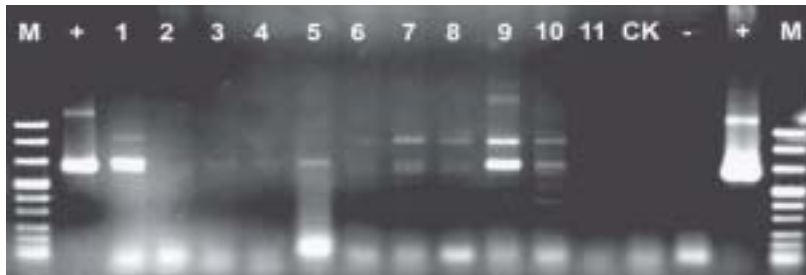


圖1-1、轉移SAP1基因到'Black magic'彩色海芋再生植株的葉片DNA經PCR檢測反應之產物在電泳膠片上分離之情形。M, marker; +, 農桿菌plasmid; 1-11, 轉植株DNA; ck, 未轉植株; -, blank。



圖1-2、轉移SAP1基因到'Black magic'彩色海芋再生植株的葉片DNA經南方墨點雜交法以放射線探針分析之情形。+, 農桿菌plasmid; 1-11, 轉植株DNA; ck, 未轉植株; -, blank。

(二)火鶴花與彩葉芋利用農桿菌進行花色基因轉移之研究

沈翰祖、孫永偉、廖玉珠、陳駿季

由於火鶴花為目前全世界之重要切花之一，而彩葉芋亦為極具潛力之盆栽觀葉植物，但二者之花色卻僅有紅、粉紅、白或具有綠斑等色系，顏色變化較少，而導致消費者的選擇性降低，故不易與其他較多花色種類的切花與盆花競爭，成為市場之主流花卉。因此，本試驗利用植物組織培養技術誘導癒合組織形成，並以此為材料進行花色基因轉移，創造新的花色。

為建立火鶴花、彩葉芋農桿菌基因轉殖再

生體系，培植體採用組培瓶苗，其中火鶴花'Feugo'品種之葉柄先利用全黑暗培養2個月，培養基配方為1/8 MS、BA 1ppm、2,4-D 0.08ppm以誘導癒傷組織，再移至照光16小時培養2個月，培養基配方為1/8 MS、BA 1ppm誘導芽梢再生之效果最好(表1-1,1-2)；彩葉芋'Freida Hemple'品種之葉片與葉柄利用照光16小時培養2個月，誘導芽梢再生之效果最好(表1-3,1-4)，培養基配方與火鶴花相同，經農桿菌基因轉移法轉殖花色基因後，以螢光顯微鏡檢測其篩檢標誌GFP，具有綠色螢光反應(圖1-3)。

表1-1、火鶴花'Feugo'品種葉柄以全黑暗與照光16小時處理2個月後之結果。

Medium	Dark (D)		Light (L)	
	Callus induction rate(%)	Color of explants	Callus induction rate (%)	Color of explants
TO-t	88.8	Light yellow	0	Green
TO-p	83.1	Light yellow	0	Green

※D: dark treatment, L: 16hr/8hr (light/dark)。

表1-2、火鶴花'Feugo'品種經不同黑暗與照光處理所誘導之癒傷組織再分別培養於全黑暗(D)與照光16小時環境(L)2個月後之情形。

Medium	Callus induced from*	D treatment	L treatment
		Shoot regeneration rate (%)	Shoot regeneration rate(%)
T1-t	D	0	78
T1-t	L	-	24
T1-p	D	0	67
T1-p	L	-	12

※D: dark treatment, L: 16hr/8hr (light/dark)。

表1-3、彩葉芋'Freida Hemple'品種之葉片與葉柄以全黑暗與照光16小時處理1個月後之結果。

Medium	Dark (D)		Light (L)	
	Callus induction rate(%)	Color of explants	Callus induction rate (%)	Color of explants
TO-t	0	Green	100	Green and light yellow
TO-p	0	Green	90.7	Green and light yellow

※D: dark treatment, L: 16hr/8hr (light/dark).

表1-4、彩葉芋'Freida Hemple'品種之癒傷組織直接再於照光16小時環境(L)1個月後之情形。

Medium	treatment	
	Shoot regeneration rate (%)	Color of explants
T1-t	100	Deep green and purple
T1-p	81.6	Deep green and purple

※D: dark treatment, L: 16hr/8hr (light/dark).

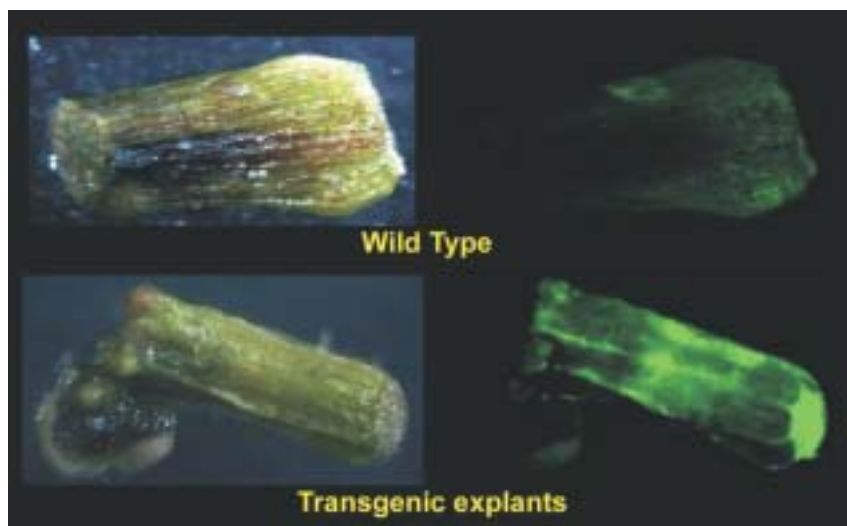


圖1-3、彩葉芋'Freida Hemple'品種經農桿菌法進行花色基因轉移與未經基因轉移者誘導之癒傷組織以螢光顯微鏡檢測其篩檢標誌GFP之綠色螢光反應。

(三)雜交海芋及拖鞋蘭亞屬間雜交種子胚挽救技術之研究

廖玉珠、陳駿季、劉明宗、廖文毅、孫永偉 沈翰祖

以21個彩色海芋品種及6個白花海芋品種進行種間雜交與自交並進行胚培養。彩色海芋之間因核型較類似故雜交親合力較大，自交與雜交的成活率可達80-100%。而與白色海芋間因核型差異大，其自交或與彩色海芋間的雜交親合力則較差，彩色海芋與白色海芋間雜交的30個組合中，有2個組合可順利形成植株（表1-5）。白色海芋與彩色海芋雜交的16個組合，則有3個組合形成植株

（表1-5）。

以芭菲爾拖鞋蘭屬之六個亞屬間互相雜交，結果顯示：多花×單花之雜交組合中以 *P. rothschildianum* 為母本之組合較其他品種為母本之組合發芽數較高。父本同為 *P. armeniacum* 之組合中發芽數以 *P. Rothschildianum* 最高，依序為 *P. St. Swithin*、*P. Prince Edward of York*、*P. philippinense* (表1-6)。在單花雜交組合方面：以 *P. armeniacum* 為父本之組合發芽數有較高之趨勢，以 *P. delenatii* × *P. armeniacum* 之組合含胚率及發芽數最高（表1-7）。

表1-5、彩色海芋及白花海芋之互交組合

	母本	父本				
編號	彩色	白花	授粉日數	挑胚數	成活數	百分率
1	Chole	Aethiopica 小	80	1	1	100%
2	Pink persursion	Wedding Song	125	24	1	4.17%
編號	彩色	白花	授粉日數	挑胚數	成活數	百分率
1	Aethiopica 小	Treasure	80	1	1	100.00%
2	Innocence	Majestic Red	64	26	20	76.92%
3	Innocence	Treasure	105	8	7	87.50%

表1-6：拖鞋蘭多花×單花雜交紀錄表

雜交品名 (♀ × ♂)	種子含胚百分比%	播種後120天 (發芽數)	未震盪處理	震盪處理
1. <i>P. rothschildianum</i> × <i>P. urbanianum</i>	56%	9800	4930	4870
2. <i>P. rothschildianum</i> × <i>P. armeniacum</i>	35%	3620	620	3000
3. <i>P. rothschildianum</i> × <i>P. delenatii</i>	6.6%	4956	2036	2920
4. <i>P. rothschildianum</i> × <i>P. micranthum</i>	--	20	20	

(續)表1-6：拖鞋蘭多花×單花雜交紀錄表

雜 交 品 名 (♀ × ♂)	種子含胚百分比%	播種後120天 (發芽數)	未震盪 處理	震盪 處理
5. <i>P.rothschildianum</i> × <i>P.conco-bellatulum</i>	29.3%	1183	193	990
6. <i>P.philippinense</i> × <i>P. armeniacum</i>	3.3%	184	64	120
7. <i>P.Prince Edward of York</i> × <i>P.armeniaceum</i>	5.7%	403	240	163
8. <i>P.Prince Edward of York</i> × <i>P.armeniaceum</i>	---	785	183	600
9. <i>P.St.Swithin</i> × <i>P.armeniaceum</i>	5.67%	1341	412	929
10. <i>P.Vanguard</i> × <i>P.urbanianum</i>	---	1251	441	810
11. <i>P.Vanguard</i> × PAH-031 (<i>delenatii</i> × <i>emersonii</i>)	---	1450	380	1070

表1-7、拖鞋蘭單花×單花雜交紀錄表

雜 交 品 名 (♀ × ♂)	種子含胚百分比%	播種後120天 (發芽數)	未震盪 處理	震盪 處理
1. <i>P.conco-bellatulum</i> × <i>P.micranthum</i>	---	149	149	×
2. <i>P.deleatii</i> × <i>P.armeniaceum</i>	50.7%	2996	1246	1750
3. <i>P.delenatii</i> × <i>P.micranthum</i>	9%	130	×	130
4. <i>P.delenatii</i> × <i>P.urbanianum</i>	6.3%	130	130	
6. <i>P.esquirolei</i> × <i>P.armeniaceum</i>	---	63	41	22
7. <i>P.malipoense</i> × <i>P.armeniaceum</i>	8.3%	1065	185	695
8. <i>P.villosum</i> × <i>P.armeniaceum</i>	9.5%	151	135	16
9. <i>P.papletonianum</i> self	---	1230	590	640
11. PAH-031 (<i>delenatii</i> × <i>emersonii</i>) × <i>P.armeniaceum</i>	---	349	111	238

※ ---表含胚率未測定

(四) 内生菌根菌應用於木瓜田間示範推廣

柯天雄 邱展臺 戴雍發

叢枝内生菌根菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是一種能與植物根部共生的有益土壤微生物，感染宿主植物後，其根外菌絲可延伸8公分或更遠之距離，協助植物吸收水分及氮、磷、鎂、鈣、銅、鋅等礦物營養，由穴盤育苗及田間試驗結果顯示，木瓜育苗時接種菌根菌有提升種苗品質、提高幼

苗移植存活率、提早抽出花芽及採收果實、減少肥料用量及節省成本等五點益處。

本場與屏東科技大學自八十六年度起示範推廣5.6公頃(28,000苗)，並於八十七年六月廿三日於屏東縣高樹鄉舉辦示範成果觀摩會，八十七年度示範推廣35公頃(175,000苗)；八十八年度示範推廣100公頃(500,000苗)；八十八下半年及八十九年度示範推廣160公頃(800,000苗)，並於八十九年五月九日於雲林縣林內鄉舉辦示範成果觀摩會，八十九年八月廿二日於屏東科技大學舉

辦木瓜育苗接種菌根菌技術講習會；九十年度示範推廣200公頃(1,000,000苗)，雲林縣334,780苗最多，次為屏東縣294,920苗，再其次為高雄縣165,000苗；九十一年度示範推廣200公頃(1,000,000苗)，雲林縣

322,660苗最多，次為屏東縣315,560苗，再其次為高雄縣167,400苗(圖1-4)，合計示範推廣700.6公頃(3,503,000苗)，舉辦示範成果觀摩會2場次，接種菌根菌技術講習會1場次。

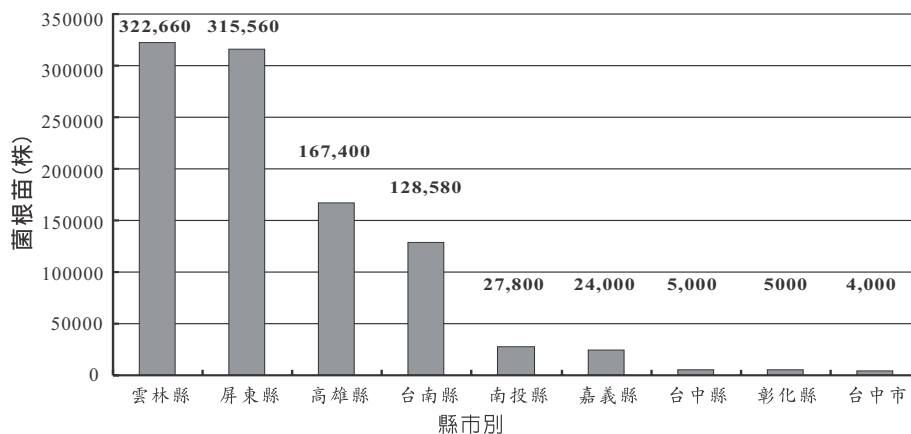


圖1-4、木瓜接種菌根菌九十一年度示範推廣數量

(五)拖鞋蘭及文心蘭盆栽品種組培苗變異及品種差異性鑑定技術之建立

孫永偉

本試驗係以UBC Primers(引子)#1~100組測試芭菲爾拖鞋蘭六大亞屬*Parvisepalum*、*Sigmatopetalum*、*Polyantha*、*Brachypetalum*、*Paphiopedilum*、*Coclopetalum*等，及文心蘭*Oncidium*及*Colmanara*等屬間原生種之RAPD電泳圖譜關係。結果顯示拖鞋蘭綠葉多花種*Polyantha*亞屬於Primer#20、31及40之PCR產物分別出現1200、1500及1100 bp特定條帶。綠葉多花種*Coclopetalum*亞屬於Primer#31、33及40之PCR產物分別出現1100、550及700 bp特定條帶。斑葉單花種*Parvisepalum*亞屬只於Primer#31之PCR產物出現600 bp特定條帶。斑葉單花種

*Sigmatopetalum*亞屬原生種於Primer#20、31及64之PCR產物分別出現1500、900及1200 bp特定條帶。目前尚未發現特定Primers可區分*Brachypetalum*及*Paphiopedilum*亞屬間原生種。文心蘭*Oncidium*屬之原生種以Primers#6及15之PCR產物分別500及700 bp特定條帶。文心蘭*Colmanara*屬之原生種以Primers#4、28及30之PCR產物分別950、2000及1000 bp特定條帶。本試驗初步結果顯示以UBC #20、31、33、40及64為引子所獲得之RAPD圖譜，可以區分拖鞋蘭不同亞屬間原生品種差異性；另可以UBC #4、6、15、28及30為引子所獲得之RAPD圖譜，可以區別文心蘭*Oncidium*及*Colmanara*不同屬間原生品種差異性(圖1-5,1-6)。

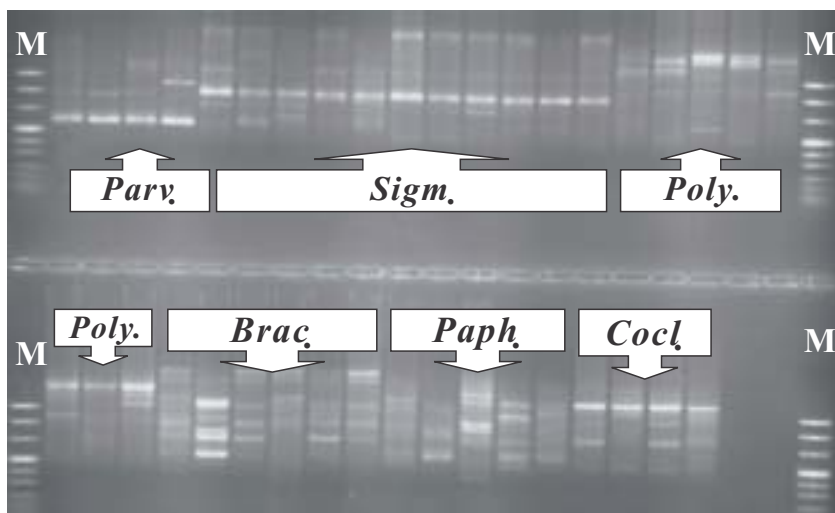


圖1-5、以UBC primer #31測試拖鞋蘭不同亞間生種之電泳圖譜

Fig.1. Agarose electrophoresis of the PCR products of UBC primer #31 amplified from genomic DNA isolated from native species of *Paphiopedilum*

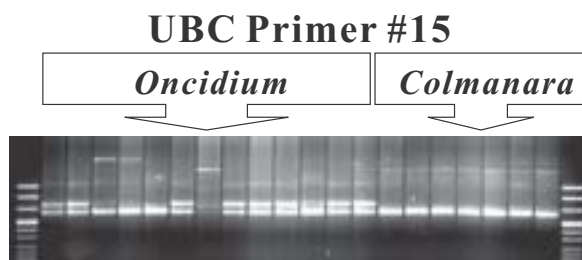


圖1-6、以UBC primer #15測試文心蘭*Oncidium*及*Colmanara*屬原生種之電泳圖譜

Fig.2. Agarose electrophoresis of the PCR products of UBC primer #15 amplified from genomic DNA isolated from native species of *Oncidium* and *Colmanara*

六) 文心蘭種苗品質改進之研究

沈翰祖、孫永偉、廖玉珠、楊佐琦、
蕭芳蘭、陳駿季

文心蘭組培苗由於增殖倍率高，常導致植株有變異的產生，而降低種苗的品質。本計畫目的擬建立組培苗變異偵測技術，並追蹤變異對植株生長勢與種苗品質之影響。

變異檢測結果顯示試驗之100組UBC RAPD Primer中有54組在PCR反應具有電泳條帶，包括UBC No. 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30,

31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 43, 56, 59, 65, 66, 71, 72, 73, 74, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 89, 90, 91, 95, 96, 98 (圖1-7)。其PCR反應流程為 94°C 2 分鐘，35°C 2 分鐘，72°C 2 分鐘，共 35 個 cycle。反應之 PCR反應器為 Peltier Thermal Cycler (PTC-200; MJ Research, inc.) 中進行。其中以 1, 3, 4, 5, 6, 13號 primer進一步進行瓶苗變異篩檢，有部分瓶苗有非常規之電泳條帶出現(圖1-8)，將進一步追蹤其成株表現。

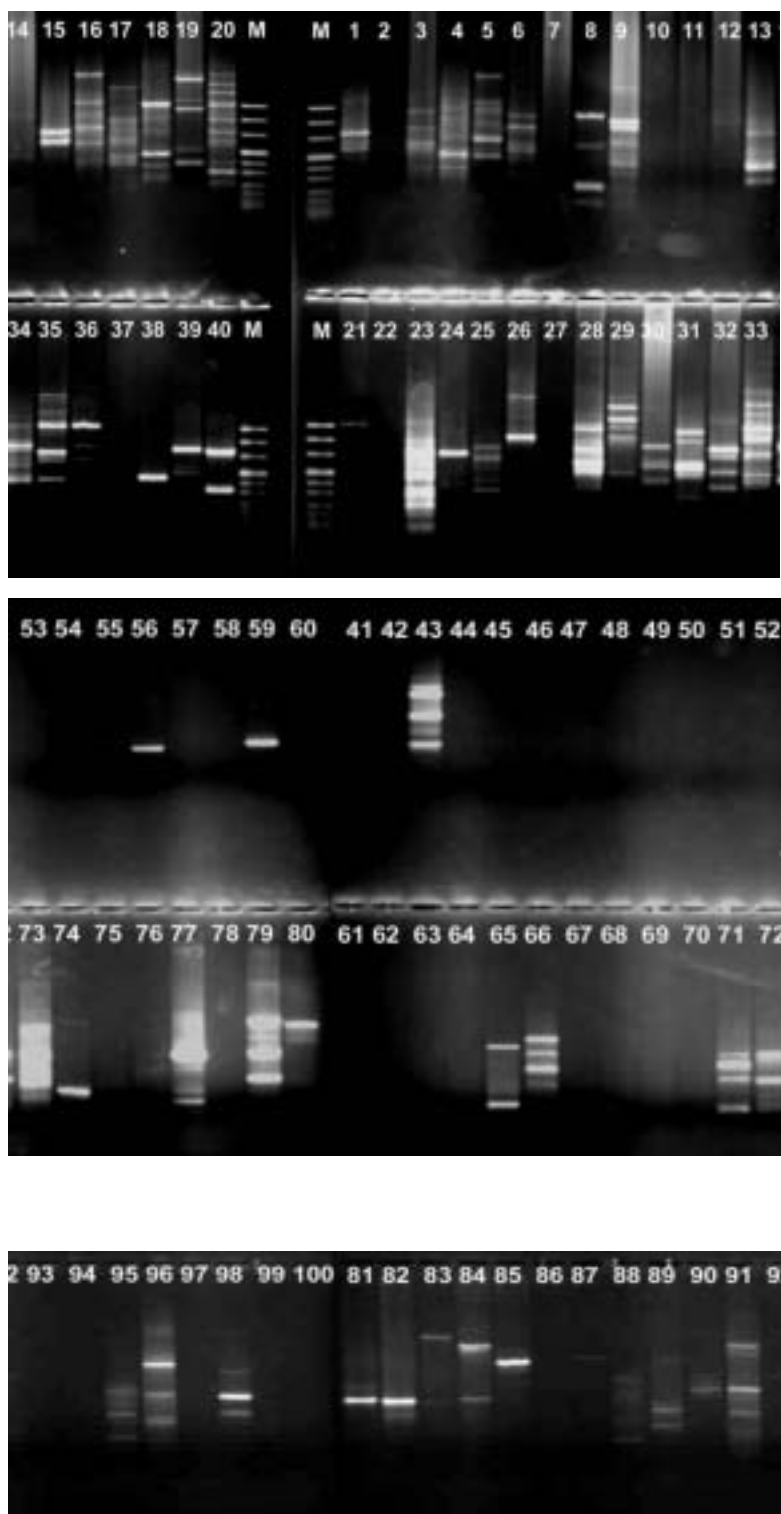


圖1-7、文心蘭利用PCR反應選出100組UBC RAPD Primer中進行電泳分析 M: Marker; 1-100: UBC primer No.

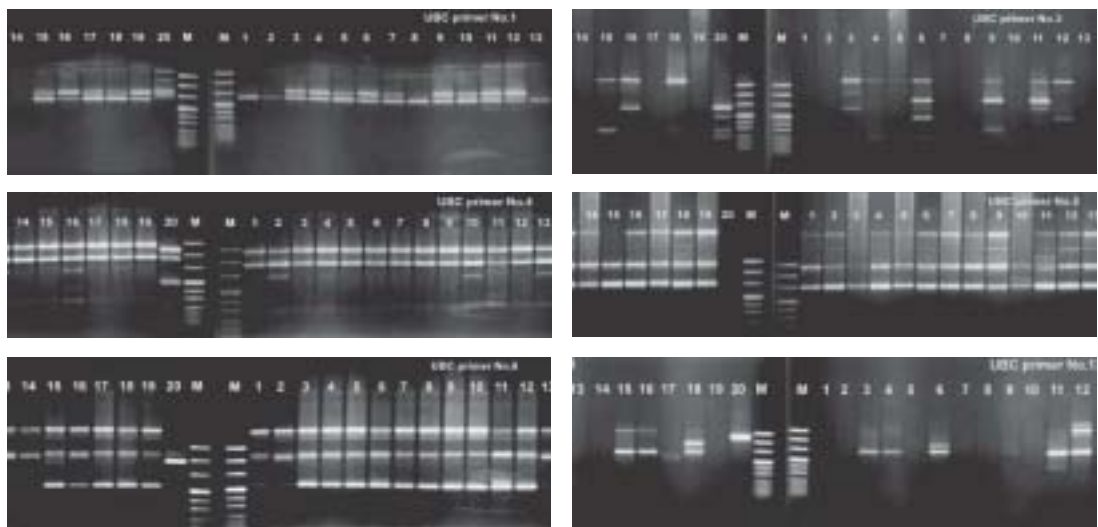


圖1-8、文心蘭利用UBC 1, 3, 4, 5, 6, 13號RAPD primer進行瓶苗變異篩檢
M: Marker; 1-20: 文心蘭瓶苗編號

表1-8、文心蘭組培苗利用UBC RAPD primer進行瓶苗變異篩檢統計表

植株編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
primer No.1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
primer No.3	電泳條帶表現不均一																			
primer No.4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
primer No.5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
primer No.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
primer No.13	電泳條帶表現不均一																			

+: 出現非常規之電泳條帶; -: 沒有出現非常規之電泳條帶

七)彩色海芋組織培養苗之量化生產

文紀鑾

取彩色海芋組培苗大量生產的繁殖可分為增植培養、發根培養、瓶苗馴化，生產過程中以自動化機械輔助生產。

彩色海芋利用球莖上頂芽或側芽為培植體進行增殖培養，誘導形成叢生芽體，經過病毒檢測，再大量繁殖，在量化生產過程中以研發完成之培養基自動配藥系統配製培養基，再配合自動充填系統將培養基定量充填至培養瓶中，最後經高溫殺菌後完成培養

基配製動作；芽體經增殖後切割成單芽，置於發根瓶中，待瓶苗發根培養七天後，移出培養室至溫室馴化，瓶苗發根馴化後，以瓶苗方式供苗。

本年度共生產Black Magic(淡黃色)品種18100苗、Florex Gold(金黃色)品種25420苗、Extra Gold(金黃色)品種9750苗、Majestic Red(紅色)品種28900、Pacific Pink(粉紅色)品種51075苗及Neroli(橘黃色)品種30200苗等六品種，約計163445苗，銷售給農民。