

一、生物技術及組織培養

一) 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

火鶴花為目前全世界之重要切花之一，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。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。

火鶴花經農桿菌法進行花色基因轉移之轉殖

株以 40ppm Hygromycin 篩檢火鶴花 Fuego 品種，轉殖 Anti-sense CHI 基因的再生植株之篩選成活率為 12.2%，轉 F3'5'H 基因之篩檢為 16.3%；P1 品種，轉殖 Anti-sense CHI 基因的再生植株之篩選成活率為 12.2%。彩葉芋 Freida Hemple 品種經農桿菌法之轉殖株以 40ppm Hygromycin 篩檢轉殖 DFR 基因的再生植株之篩選成活率為 15.9%，轉 Anti-sense DFR 基因之篩選成活率為 15.5%，轉 F3'H 基因之篩選成活率為 8.0%，轉 Anti-sense CHI 基因之篩選成活率為 11.3%(表 1-1)；並以螢光顯微鏡檢測篩檢標誌 GFP，具綠色螢光反應。

表 1-1、花色基因轉移以 40ppm Hygromycin 篩檢成活率統計表

作物	品種	轉殖基因	Hygromycin 篩檢成活率
火鶴花	Fuego	Anti-sense CHI	12.2%
		F3'5'H	16.3%
	P1	Anti-sense CHI	12.2%
彩葉芋	Freida Hemple	DFR	15.9%
		Anti-sense DFR	15.5%
		F3'H	8.0%
		Anti-sense CHI	11.3%

二) 拖鞋蘭原生種分子鑑定技術開發

孫永偉、廖文毅、廖玉珠、劉明宗、何陽停、沈翰祖、文紀瑩、陳駿季

芭菲爾拖鞋蘭(*Paphiopedilum*)，主要下分 *Parvisepalum*、*Sigmatopetalum*、*Polyantha*、*Brachypetalum*、*Paphiopedilum*、*Coclopetalum*

等六亞屬(Karasawa and Saito,1982)或 *Parvisepalum*、*Brachypetalum*、*Paphiopedilum* 等三亞屬(Cribb,1997)二種分類方式。本試驗係以 200 組隨機引子(UBC1~100、801~900)進行隨機增殖多型性 DNA 方法分析，建立芭菲爾拖鞋蘭六亞屬 31 個原生種之 RAPD 多型性電泳圖譜，並進行親源關係分析，以瞭解各亞屬間原生種遺傳關聯性，

同時建立可作為鑑定屬間原生種差異性之分子標記(markers)。試驗結果顯示，200 組隨機引子中有 65 組引子在 PCR 反應後，可產生 571 個多型性條帶。有 4 個條帶為 *Brachypetalum* 亞屬原生種所特有，2 個條帶為 *Parvisepalum* 亞屬原生種所特有，7 個條帶為 *Paphiopedilum* 亞屬部分原生種所特有。利用 Nei & Li 方法計算品種間遺傳相似度及以 UPGMA 方式進行群叢分析(cluster analysis)建立親緣關係圖(圖 1-1)，顯示，18 個原生種可分成 3 群，最大群品種多屬 *Paphiopedilum* 亞屬，該群可再細分為 4 個次群，另 3 個原生種獨立於 3 群之外，此結果近似 Cribb(1997)分類方式。

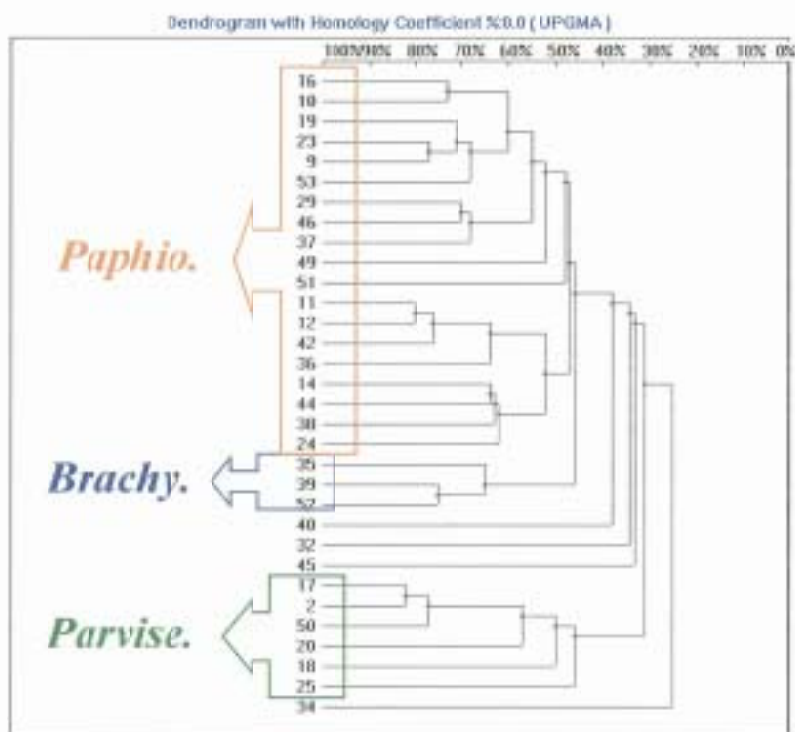


圖 1-1. 芭菲蘭拖鞋蘭原生種間群叢分析結果

三) 蝴蝶蘭組培苗去病毒暨拖鞋蘭亞屬間雜交種子繁殖技術之建立

孫永偉、廖玉珠、沈翰祖、陳峻孝

由本場及合作對象提供具有 CyMV 及 ORSV 病毒之蝴蝶蘭瓶苗為試驗材料，建立 RT-PCR 檢測技術及探討不同物理及化學處理對去除瓶苗病毒之可行性。結果顯示(圖 1-2)以單組 CyMV 或 ORSV 病毒 primers 進行 RT-PCR 分析之偵測病毒靈敏度遠高於以一組 primers 同時檢測 CyMV 及 ORSV 病毒。去除蝴蝶蘭瓶苗病毒研究，利用電穿孔儀器設定不同電擊條件將不同藥劑送入培植體內，目前已篩選出一些處理組合可明顯降低培植體病毒量。降低樣品檢測成本之研究，本試

驗測試不同 RNA 萃取純化及 RT-PCR 反應試劑組，結果顯示利用國產 RNA 萃取試劑及 one step RT-PCR 試劑仍可獲得高靈敏度之檢測結果，所需檢測試劑成本費用可減少 50% 以上。



圖 1-2、不同藥劑及電擊條件處理對去跡蝴蝶蘭瓶苗之影響。上圖為檢測瓶苗 CyMV 病毒之 RT-PCR 結果。

四) 培養基配製技術之研究

文紀嬰

1. 塑膠培養瓶之設計

組培瓶塑膠材質以聚碳酸酯(PC)及聚丙烯(PP)具高透光率，耐高溫高壓，且可重複使用是組培瓶的良好材料，而瓶內光分佈均勻則以圓柱形瓶為最佳。

2. 組織培養自動封蓋系統之設計

封蓋系統具備三功能：

(1)利用紫外線燈及高效率過濾網作機械與封膜殺菌。(2)封蓋流程在無菌下作業。(3)採用觸控式封蓋流程。

3. 塑膠培養容器對彩色海芋、草莓、葡萄組培苗發根培養之影響

彩色海芋、草莓、葡萄組培苗發根培養於玻璃及塑膠培養容器內，並利用 silicone 作封口處理與否，彩色海芋發根培養 45 天後在芽高度、葉數、根長度、根數其四處理間差異不明顯，移植成活率達 100 %。

葡萄組培苗於發根培養基中，培養 10 天後，發現在塑膠培養瓶且用 silicone 封口之處理組芽體全部死亡，培養 30 天後，其它三處理在芽高度及葉面積無明顯差異，在玻璃培養瓶且用 silicone 封口之處理組葉面積最小(0.64cm)根數最少(4.0)，但三處理間其移植成活率達 98.5-99.2

%。

草莓組培苗於發根培養基中，培養 10 天後，發現在塑膠培養瓶且用 silicone 封口之處理組芽體全部死亡，培養 30 天後，其它三處理在葉數及根數無明顯差異，在塑膠培養瓶未用 silicone 封口之處理組芽高度最短(2.5cm)根長最短(4.4cm)，但三處理間其移植成活率達 97.2-98.0 %。

五) 海芋、拖鞋蘭及蝴蝶蘭等重要花卉組織培養技術之建立

廖玉珠、陳駿季、劉明宗、廖文毅、孫永偉、沈翰祖

彩色海芋與白花海芋不同種源雜交後，取胚培養於試管內結果顯示，母本為(彩色海芋×白花海芋)回交彩色海芋成活率可達 96%，若(彩色海芋×白花海芋)自交雜種子數很少但成活率可達 100%(表 1-2)。

拖鞋蘭種子因胚本身發育不完全，或培養基培養條件不適合，於無菌播種後發芽率有偏低之現象。以 92 年度 36 個雜交組合調查含胚率結果顯示：以 *P. micranthum* 為父本或母本之雜交組合其含胚率皆低於 6.2%(表 1-3)。

不同品種及培養基成分對蝴蝶蘭分生苗誘導之擬芽球體(PLB)增殖，有明顯之差異。試驗結果顯示：*P. amabilis* 及 *Dips* 'Queen Beer' 品

種於含馬鈴薯泥之培養基中有褐化現象(圖 1-3)。
Dtps, 'Sinic Sunday' 於含椰子汁不含糖之培養
 基或於含馬鈴薯泥之培養基中 PLB 均可正常增

殖(圖 1-4)。*Dtps*, 'Minho Venus' 於含椰子汁及
 糖之培養基中則有褐化現象(圖 1-5)。

表 1-2: (彩色海芋 × 白花海芋) × 彩色海芋調查表

9224	(EM × W)	<i>Millicum gold</i>	17	17	100%
9237	(BG × W2 - 2 - 3)	<i>Millicum gold</i>	26	25	96%
9227	(BG × W - 2 - 2 - 3)	FG	5	5	100%
9229	(BG × W2 - 2 - 3)	自交	1	1	100%
9230	(BG × W2 - 2 - 3)	自交	1	1	100%
9231	(BG × W1 - 1 - 1 - 2)	自交	1	1	100%

表 1-3: 拖鞋蘭播種含胚率調查表

雜交品名		種子含胚率(%)
母本	父本	
<i>P. bellatulum</i> 'selection' × <i>P. Stored Susan</i>	<i>P. delenatii</i>	5.3
<i>P. appletionianum</i>	<i>P. micranthum</i>	7.1
<i>P. argus</i>	<i>P. armeniacum</i>	6.6
<i>P. armeniacum</i>	<i>P. Lawrenceanum</i>	20.5
<i>P. armeniacum</i>	<i>P. urbanicum</i>	23.0
<i>P. armenioeum</i>	<i>P. maliponse</i>	43.2
<i>P. barbatum</i>	<i>P. micranthum</i>	1.1
<i>P. barbatum</i>	<i>P. armeniacum</i>	39.8
<i>P. barbatum</i>	<i>P. armeniacum</i>	37.6
<i>P. conco- bellatulum</i>	<i>P. parmeniacum</i>	22.6
<i>P. callosum</i>	<i>P. armeniacum</i>	0
<i>P. conco-bellatulum</i>	<i>P. armeniacum</i>	33.9
<i>P. curtisii</i>	<i>P. armeniacum</i>	10.1
<i>P. delenatii</i>	<i>P. bellatulum</i>	15.4
<i>P. delenatii</i>	<i>P. Leucooilnilum</i>	27.7
<i>P. delenatii</i>	<i>P. vissoum</i>	4.6
<i>P. delenatii</i>	<i>P. conco-bellatulum</i>	24.8
<i>P. glaucophyllum</i>	<i>P. malipoense</i>	38.6
<i>P. glaucophyllum</i>	<i>P. delenatii</i>	63.1
<i>P. hainanensis</i>	<i>P. micranthum</i>	0.8
<i>P. hainanensis</i>	<i>P. glaucophyllum</i>	20.3
<i>P. hainanensis</i>	<i>P. delenatii</i>	20.4
<i>P. hairanensis</i>	<i>P. armeniacum</i>	23.0
<i>P. lawrenceanum</i>	<i>P. micranthum</i>	0.3
<i>P. lawrenceanum</i>	<i>P. armeniacum</i>	50.5

<i>P. lawrenceanum</i>	<i>P. rothschildianum</i>	7.7
<i>P. leucochilum</i>	<i>P. micranthum</i>	5.2
<i>P. liliolare</i>	<i>P. micranthum</i>	1.3
<i>P. micranthum</i>	<i>P. villsoum</i>	0.9
<i>P. micranthum</i>	<i>P. lawrenceanum</i>	18.9
<i>P. micranthum</i>	<i>P. curtisii</i>	3.6
<i>P. Primulinum</i>	<i>P. delenatii</i>	91.7
<i>P. rothschildianum</i>	<i>P. delenatii</i>	26.1
<i>P. urbanianum</i>	<i>P. delenatii</i>	10.2
<i>P. wardii</i>	<i>P. armeniacum</i>	88.4
<i>P. callosum</i>	<i>P. micranthum</i>	6.5



圖 1-3、*P. analitix* 及 *Dtps. Queen Beer* 於含椰子汁不含糖之培養基正常生長(圖左)，含馬鈴薯泥糊化(圖右)



圖 1-4、*Dtps. Minho Venus* 於含椰子汁不含糖(圖左)及含馬薯泥皆正常生長(圖右)



圖 1-5、*Dtps. Minho Venus* 於含椰子汁及糖有糊化現象(圖左)，含椰子汁不含糖則正常生長(圖右)

六) 文心蘭種苗品質改進之研究

沈翰祖、孫永偉、廖玉珠、楊佳琦、
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。本計畫目的擬針對文心蘭瓶苗變異或帶有病源菌與否，建立偵測技術；其次針對植株生長勢、病源菌等建立品質認證體系，並探討以提昇種苗業的競爭力。

文心蘭“南茜”品種瓶苗以 One-step RT-PCR 方式檢測 ORSV、CyMV 等病毒，經檢測後均為無病毒之健康植株，以人工接種 ORSV、CyMV 病毒(圖 1-6)，研究病毒對瓶苗增殖影響。健康

無病毒文心蘭母瓶，經六次繼代培養後均未測出病毒。以瓶苗瓶內人工接種病毒，單一與複合感染由文心蘭取得的病毒接種共 80 株，組培苗共經過 10 次繼代培養，結果顯示，人工接種

病毒者在繼代培養之增殖倍率平均略高於未接種之對照植株，其中以 CyMV 最甚，而平均芽高與芽重亦以 CyMV 較高，但與對照組差異不顯著(表 1-4)。



圖 1-6、文心蘭組培苗人工接種苗舌蘭雜斑病毒(ORSV)與東亞蘭嵌紋病毒(CyMV)於接種 2 週後，組培苗之生育情形。

CK：對照組；CyMV：單獨感染由文心蘭萃取 CyMV 之植株；ORSV：單獨感染由文心蘭萃取 ORSV 之植株；CyMV + ORSV：複合感染由文心蘭萃取 CyMV 與 ORSV 之植株；CyMV + ORSV(Phalaenopsis)：複合感染由蝴蝶蘭萃取 CyMV 與 ORSV 之植株

表 1-4、文心蘭繼代培養之平均芽高與芽重統計表

總代 接種	第一次人工接種						第二次人工接種					
	每月繼代一次			二月繼代一次			每月繼代一次			二月繼代一次		
	R5			R6			R3			R4		
	倍率	平均 芽高 (cm)	平均 芽重 (g)	倍率	平均 芽高 (cm)	平均 芽重 (g)	倍率	平均 芽高 (cm)	平均 芽重 (g)	倍率	平均 芽高 (cm)	平均 芽重 (g)
O	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.1	1.7	0.1	6.0	2.2	0.3
C	1.4	3.4	0.2	2.9	3.9	0.3	1.0	2.2	0.1	8.0	3.3	0.2
O+C	1.2	2.9	0.3	2.6	3.9	0.3	1.3	2.3	0.1	5.5	3.7	0.2
O-P	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.4	2.4	0.1	5.0	2.9	0.2
C-P	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.0	1.7	0.1	9.0	3.5	0.1
O+C-P	1.5	2.4	0.3	3.0	2.9	0.2	1.4	1.6	0.1	4.0	1.8	0.2
CK	1.7	3.3	0.3	2.8	3.5	0.2	1.2	2.9	0.1	7.0	3.6	0.2

O：文心蘭萃取之 ORSV；C：文心蘭萃取之 CyMV；O + C：文心蘭萃取之 ORSV 與 CyMV 複合感染；O-P：蝴蝶蘭萃取之 ORSV；C-P：蝴蝶蘭萃取之 CyMV；O + C-P：蝴蝶蘭萃取之 ORSV 與 CyMV 複合感染；CK：對照組

七) 内生菌根菌應用於果樹與果菜作物之示範推廣

柯天雄、邱展臺、戴癡登

叢枝菌根菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)為存在土壤內之有益真菌，能與大多數植物共生形成菌根，其根外菌絲可延伸 8 公分或更遠之距離，幫助植物吸收水分及礦物營養，特別是磷肥。

本研究於木瓜穴盤育苗播種時接種 *Glo-mus* 屬菌根菌，探討對穴盤幼苗及定植田間後生育之影響，結果顯示，接種之菌根菌與木瓜根系具有親和性，菌根形成率達 52.7%，接種菌根菌組其株高、葉片數、地上部鮮重、根鮮重與葉面積皆優於未接菌組，顯見可提昇木

瓜種苗品質。穴盤幼苗移植田間後可提高幼苗移植存活率、提早開花及採收果實，減少肥料用量及節省成本等益處。自 1997 至 2002 年示範推廣内生菌根菌接種源給木瓜育苗業者、產銷班或農民應用已達 700 公頃，2003 年示範推廣木瓜及洋香瓜 200 公頃(1,000,000 苗)，屏東縣 269,230 苗最多，次為雲林縣 222,760 苗，再其次為台南縣 195,010 苗(圖 1-7)。

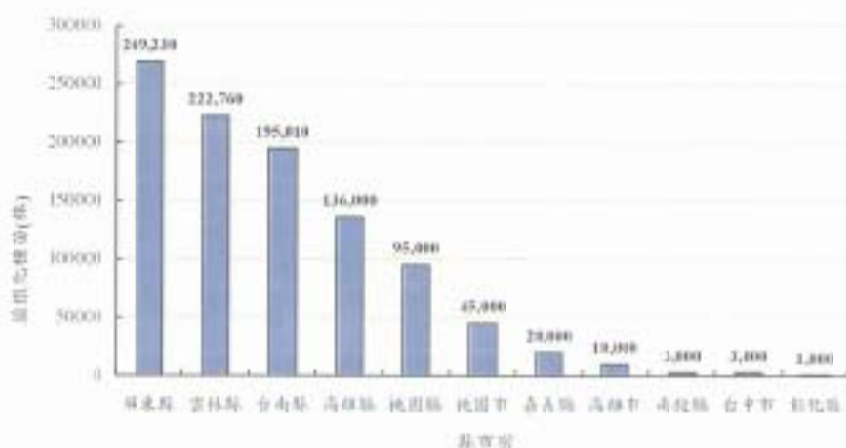


圖 1-7、木瓜及洋香瓜接種菌根菌九十二年度示範推廣數量

八) 番木瓜新型純兩性株之遺傳分析及其利用研究

邱展臺

本年度種植由全兩性株與泰國種之雜交第二代(F_2)，具全兩性株特性植株行中選取 18 個單株，以株行方式種植其自交後代(F_3)，結果有 3 個株行兩性株比例達 100%，有 14 個株行兩性株比例為 91.4%~99.5%，平均 95.6%，較 F_2 之 89.3% 兩性株比例增加 6.3%，經卡方測驗 15 個株行均符合兩性株與雌株 1:0 的比例(表 1-5)，而編號 8-36 之單株雖選自兩性株與雌株比例為 111:14(1 兩性株:0 雌株)之株行，但

其自交後代兩性株與雌株比例為 63:24(2 兩性株:1 雌株)，與其兄妹植株 8-9、8-22 之自交後代性別呈 1 兩性株:0 雌株的比例不同，其原因為此植株雌性因子 m 與致死因子之連鎖被打破，雌株能正常存活，故呈一般品種之性別遺傳為 2 兩性株:1 雌株(表 1-6)。

由全兩性株與泰國種之回交第一代(BC_1)具全兩性株特性植株行中選取 6 個單株，以株行方式種植其自交後代(BC_1F_2)，結果有 6 個株行共 491 株，只出現 1 株雌株，顯示全兩性株特性已獲得相當程度的固定。之前對全兩性株所做之推論「全兩性株品系之雌性因子 m 鄰近區域有一隱性致死因子與之連鎖，當雌性因子

mm 同質結合時，致死因子亦同質結合，使得雌株結合子無法成活，因而在全兩性株族群中無

雌株出現。」從 F₂ 及 BC₁F₂ 性別比例獲得進一步確認。

表 1-5、泰國種兩性株 × SR* 後代兩性株自交之 F₂ 植株性別分別

F ₂ (Thailand × SR* ♀) ♀ ♂	No. of F ₂ plants		Expected ratio	χ ²
	♀ 植株編號	♀	♂ : ♀	
5-1	81	6	1 : 0	0.348
5-3	83	1	1 : 0	0.003
5-13	52	2	1 : 0	0.042
8-9	66	6	1 : 0	0.420
8-22	53	5	1 : 0	0.349
8-36	63	24	2 : 1	0
9-7	84	2	1 : 0	0.047
9-31	105	1	1 : 0	0.009
9-37	57	1	1 : 0	0.017
13-1	46	3	1 : 0	0.184
13-4	90	0	1 : 0	0.003
13-7	75	1	1 : 0	0.003
14-2	86	0	1 : 0	0.003
14-3	74	1	1 : 0	0.004
14-4	78	5	1 : 0	0.244
20-1	71	0	1 : 0	0.003
20-5	81	2	1 : 0	0.027
20-7	95	1	1 : 0	0.003

χ²_{0.05,1} = 3.841 ; 表中χ²係經葉氏(Yates)連續性校正。

表 1-6、以泰國種兩性株為 F₁ 母本與 SR* 回交之第二代性別分離

(Thailand × SR*) × SR* ♀ ♂	No. of F ₂ plants		Expected ratio	χ ²
	♀	♂	♂ : ♀	
5-1	73	0	1 : 0	0.003
8-14	69	0	1 : 0	0.003
8-19	80	0	1 : 0	0.003
9-7	84	1	1 : 0	0.012
13-6	103	0	1 : 0	0.003
13-9	82	0	1 : 0	0.003

χ²_{0.05,1} = 3.841 表中χ²係經葉氏(Yates)連續性校正。

九) 球根花卉接種內生菌根菌養球效益之研究

柯天雄 邱晨臺 戴雅芬

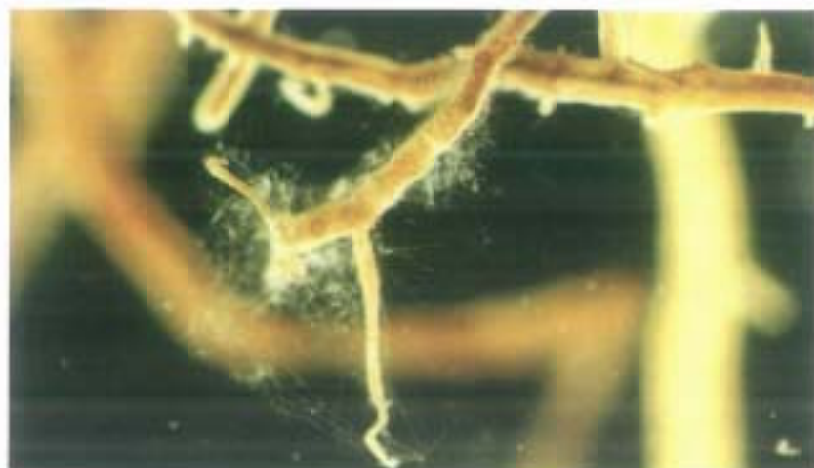
叢枝菌根菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是一種能與植物共生的土壤有益微生物。其孢子在土壤中發芽後，發芽管及菌絲會受合適宿主根部分泌物的吸引而延伸至根附近，並於根表面蔓延形成附著器，由附著器下方伸出侵入菌絲，其根外菌絲可幫助宿主植物吸收土壤中的礦物元素及水分等，因而促進宿主植物的生長。

本年度以 *Glomus mosseae* (Gm)、*G. etunicatum* (Ge)、*G. fasciculatum* (Gf)、*G. clarum* (Gc)、*Acaulospora* sp (Asp)、*Gigaspora* sp (Gg)等 6 種菌根菌分別接種於薑荷花(*Curcuma alismatifolia*)2~3cm 大小之種球並栽培於盆鉢，及將 Gm 混合 Ge 之菌根菌接種源接種於 2~3cm 大小之種球並栽培於田間。結果顯示盆鉢栽培至 12 週，以分別接種 Gm、Ge 菌處理之植株高度 48.88cm、48.54cm 略高於其他接種源；各接種菌處理之莖徑生長均於 8mm 至 9mm 間，差異不明顯；各處理組間葉片數差異亦不顯著。栽

培至 20 週後，以分別接種 Gm 菌、Ge 菌處理之植株高度 62.83cm、58.72cm 明顯高於其他處理；各處理之莖徑生長均於 8.83mm 至 10.71mm 間，差異不明顯；葉片數則以分別接種 Gm 菌、Ge 菌之 6.37 片、6.50 片明顯高於其他處理；種球莖徑以接種 Gm 菌處理 20.66mm 明顯最大；種球重於各處理間的差異不明顯，介於 6.33g 和 5.09g 間；植株根重以分別接種 Gm 菌和接種 Ge 菌明顯較其他處理組高。盆鉢栽培至 12 週與 20 週，以分別接種 Gm 菌和接種 Ge 菌處理之菌根菌感染率和感染強度高於其他接種菌處理。

田間栽培至 12 週與 20 週，接種菌根菌處理之植株生長高度高於對照組，其餘性狀差異並不明顯。栽培萌芽後 12 週，田間接種菌根菌感染率和感染強度達到 15.75% 和 10.42%，栽培至萌芽後 20 週，田間接種菌根菌感染率和感染強度更達到 33% 和 23.67%。

整體而言，本研究以盆鉢栽培發現將不同菌根菌接種源接種於薑荷花種球上多可促進其植株生長，當中以接種 Gm 和 Ge 菌較能促進薑荷花種球和植株生長。田間栽培接種菌根菌之植株地上部及種球生長亦較不接種菌處理為佳。



菌絲